

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA EM BARRA (BA μ E) -
FUNDAMENTOS, AVANÇOS E APLICAÇÕES NA ANÁLISE VESTIGIAL DE
COMPOSTOS EMERGENTES EM MATRIZES REAIS**

Carlos Vitor de Paiva e Almeida

DOUTORAMENTO EM QUÍMICA
(QUÍMICA ANALÍTICA)

2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA EM BARRA (BA μ E) -
FUNDAMENTOS, AVANÇOS E APLICAÇÕES NA ANÁLISE VESTIGIAL DE
COMPOSTOS EMERGENTES EM MATRIZES REAIS**

Carlos Vitor de Paiva e Almeida

Tese orientada pelo Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira,
especialmente elaborada para a obtenção do grau de doutor
em Química (Química Analítica)

2014



Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

Este trabalho recebeu apoio da Fundação para a Ciência e
Tecnologia através de uma Bolsa de Doutoramento
(SFRH/BD/69951/2010)

*Aos meus Pais, à minha irmã Sílvia, ao Jaime,
aos meus sobrinhos Tiago e Sofia, e à Anna*

PREFÁCIO

A introdução a nível global de compostos químicos nos ecossistemas, tornou-se numa questão preocupante desde há várias décadas. Destas ações, podem resultar problemas que afetam tanto a saúde humana como a ambiental.

Os compostos emergentes apresentam-se como substâncias que podem induzir efeitos tóxicos ao nível da saúde pública, bem como nos ecossistemas ao nível das espécies animais e vegetais. Muitas destas substâncias encontram-se presentes ao nível vestigial em matrizes com elevada complexidade, e apresentam-se com características químicas diversas, desde polares a não-polares, voláteis a involáteis, ácidas a básicas, tornando árduo o desenvolvimento de esquemas analíticos para a correspondente monitorização. Neste sentido, novas metodologias analíticas requerem técnicas de enriquecimento com elevada sensibilidade e seletividade, em combinação com técnicas cromatográficas e/ou hifenadas apropriadas. Algumas das possíveis abordagens, passam pela miniaturização dos dispositivos de microextração analítica e melhoramento dos protocolos analíticos, tornando as metodologias mais simples, de rápida execução experimental, eficientes, de baixo custo e incluindo os conceitos da “química verde”, visando dar resposta à monitorização vestigial de muitos dos compostos prioritários em diversos tipos de matrizes.

A presente tese intitulada *Microextração Adsorativa em Barra (BAμE) - Fundamentos, Avanços e Aplicações na Análise Vestigial de Compostos Emergentes em Matrizes Reais*, propõe o desenvolvimento de novas metodologias analíticas alternativas para a deteção, identificação e quantificação de várias classes de compostos emergentes em diversas matrizes reais, nomeadamente em amostras de água de diverso tipo, bebidas, produtos cosméticos e urina. Para o efeito, recorre-se à microextração adsorativa em barra (BAμE), para monitorização vestigial de compostos emergentes, quando outras técnicas de enriquecimento apresentam limitações analíticas. A BAμE apresenta-se como uma técnica versátil e inovadora, recorrendo a um dispositivo que opera com recurso à tecnologia de amostragem por flutuação, permitindo adaptar as características sortivas para cada aplicação em particular, através da seleção da fase sorvente. Neste contexto, são propostas novas aplicações por BAμE, assim

como o melhoramento, em particular a miniaturização do dispositivo para a extração e o passo de retroextração líquida.

No decorrer da presente tese, foram efetuadas diversas publicações em revistas internacionais da especialidade com arbitragem científica, assim como de comunicações em painel quer em encontros científicos nacionais quer internacionais, como de seguida se indica:

a) Artigos em revistas internacionais da especialidade com arbitragem científica:

- C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *Determination of Steroid Sex Hormones in Real Matrices by Bar Adsorptive Microextraction (BA μ E)*. Talanta (2014). In press. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.11.013.
- C. Almeida, S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, *Advances on Bar Adsorptive Microextraction Technique - Application for the determination of pharmaceuticals in real matrices*. Submetido (2014).
- C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *Determination of Trace Levels of Parabens in Real Matrices by Bar Adsorptive Microextraction using Selective Sorbent Phases*, Journal of Chromatography A 1348 (2014) 17-26. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.04.057.
- C. Almeida, Rafał Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *Improvements on Bar Adsorptive Microextraction (BA μ E) Technique - Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices*, Talanta 120 (2014) 126-134. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.11.031.
- C. Almeida, A. Stępkowska, A. Alegre, J. M. F. Nogueira, *Determination of Trace Levels of Benzophenone-type Ultra-violet Filters in Real Matrices by Bar Adsorptive Microextraction using Selective Sorbent Phases*, Journal of Chromatography A, 1311 (2013) 1-10. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.08.007.
- C. Almeida, J. M. F. Nogueira, *Comparison of the Selectivity of Different Sorbent Phases for Bar Adsorptive Microextraction - Application to trace level analysis of fungicides in real matrices*, J. of Chromatography A, 1265 (2012) 7-16. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.09.047.

b) Comunicações em painel em encontros científicos internacionais:

- 16th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, ExTech[®], 2014, Crete, Greece:
 - Carlos V. P. Almeida, J.M.F. Nogueira, *Determination of Trace Levels of Parabens in Real Matrices by Bar Adsorptive Microextraction (BAμE) using Selective Sorbent Phases.*
- 15th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, ExTech[®], 2013, João Pessoa - PB, Brazil:
 - Carlos V. P. Almeida, Rafał Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *Advances in Bar Adsorptive Microextraction (BAμE) Technique - Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices.*
- 36th International Symposium on Capillary Chromatography and 9th GC×GC Symposium, 2012, Riva del Garda, Italy:
 - Carlos V. Almeida, José M. Nogueira, *Comparison of the Selectivity of Different Sorbent Phases in Bar Adsorptive Microextraction (BAμE) for the Determination of Fungicides in Real Matrices.*
 - Carlos V. Almeida, Anna Stępkowska, Andreia Alegre, José M. Nogueira, *Bar Adsorptive Microextraction (BAμE) for the Determination of Levels of Benzophenones UV Filters in Environmental, Biological and Commercial Matrices.*
 - Carlos Almeida, J.M.F. Nogueira, *State-of-the-art on Sorption-based Methods.*
- 36th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2011, 2011, Budapest, Hungary:
 - Carlos V.P. Almeida, Andreia Alegre, José M.F. Nogueira, *Application of Novel Sorbent Phases in Adsorptive Microextraction Techniques for the Analysis of Persistent Organic Pollutants in Environmental Matrices.*

c) Comunicações em painel em encontros científicos nacionais:

- 8º Encontro Nacional de Cromatografia, 2013, Covilhã, Portugal:
 - Carlos V. P. Almeida, Rafał Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *New Approaches in Bar Adsorptive Microextraction (BAμE) Technique – Determination of insecticide repellents in environmental water matrices.*
- 7º Encontro Nacional de Cromatografia, 2012, Porto, Portugal:
 - Carlos V. P. Almeida, J.M.F. Nogueira, *Comparison of the Selectivity of Different Sorbent Phases in Bar Adsorptive Microextraction (BAμE) for the Determination of Fungicides in Real Matrices.*
 - Carlos V.P. Almeida, A. Stępkowska, A. Alegre, J.M.F. Nogueira, *Bar Adsorptive Microextraction (BAμE) for the Determination of Levels of Benzophenones UV Filters in Environmental, Biological and Commercial Matrices.*
- XXII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, 7º Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Braga, Portugal:
 - Carlos V. P. Almeida, A. Alegre, I. Silva, J.M.F. Nogueira, *Novas Abordagens em Técnicas de Microextração Sortiva para Análise Vestigial.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a todos os que participaram ou contribuíram, duma forma direta ou indireta, para o desenvolvimento da presente tese.

Gostaria de agradecer à Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pela atribuição da bolsa individual de doutoramento, assim como à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, nomeadamente ao Departamento de Química e Bioquímica e ao Centro de Química e Bioquímica, pelo acolhimento e desenvolvimento com sucesso da presente tese.

Ao Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira, por me ter dado a oportunidade de desenvolver o presente trabalho no seu grupo de investigação, assim como aceitar a orientação da presente tese, incutindo confiança, apoio e encorajamento no decorrer do mesmo, tendo sido essenciais no desenvolvimento com sucesso do presente estudo ao longo destes quatro anos.

A todos os meus colegas de laboratório, especialmente ao Doutor Nuno Neng, pela amizade, apoio, conselhos, sugestões, encorajamento e esclarecimentos demonstrados aquando do desenvolvimento de todo este trabalho.

Um profundo agradecimento aos meus pais, à minha irmã Sílvia, ao Jaime e aos meus sobrinhos Tiago e Sofia, que são maravilhosos, pelo apoio, incentivo e paciência demonstradas ao longo de todos os anos, mas também durante o desenvolvimento deste trabalho, assim como na elaboração da tese.

À Anna Stępkowska, pelo apoio, carinho e paciência dados durante a execução deste trabalho, que foram essenciais em muitos momentos.

RESUMO

Diversas classes de compostos orgânicos emergentes apresentam elevados riscos de toxicidade ao nível da saúde pública e ambiental, e dada a contínua libertação dos mesmos para os ecossistemas naturais por parte do Homem, várias instituições internacionais têm elaborado regulamentos que visam a respetiva proibição, controlo e monitorização.

Neste sentido, a presente tese propõe a aplicação da inovadora técnica de microextração adsorptiva em barra (BA μ E), que opera no modo estático com recurso à tecnologia de amostragem por flutuação, para monitorização vestigial de várias classes de compostos emergentes, incluindo fungicidas, benzofenonas, inseticidas repelentes, parabenos, fármacos e hormonas esteroides sexuais em diversos tipos de matrizes reais. Neste contexto, desenvolveram-se diversas metodologias por BA μ E, recorrendo a fases sorventes seletivas (polímeros e sólidos nanoestruturados), seguido de retroextração com recurso a dessorção líquida (LD) em combinação com técnicas cromatográficas e hifenadas, tendo-se otimizado, validado e aplicado os procedimentos analíticos a amostras ambientais, alimentares, biológicas e de produtos comerciais.

Durante a implementação experimental, foram introduzidos melhoramentos quer ao nível da etapa de microextração, com redução do tamanho do dispositivo analítico e da quantidade de fase sorvente disponível, quer da etapa de retroextração, recorrendo a um único passo analítico com redução simultânea do volume de solvente ao nível dos microlitros, mais compatível com a instrumentação analítica. Dos resultados obtidos, as metodologias desenvolvidas demonstraram excelente desempenho analítico com elevada seletividade e sensibilidade na gama dos ppb's a ppt's, tendo revelado serem alternativas efetivas na monitorização de compostos emergentes comparativamente com outras técnicas de microextração baseadas em sorção.

Em resumo, o presente trabalho demonstra que a técnica BA μ E é uma ferramenta analítica reproduzível, de baixo custo e compatível com os princípios da química analítica verde, de fácil e rápida implementação experimental para monitorização vestigial de compostos emergentes, em matrizes com elevada complexidade e origem diversa.

PALAVRAS-CHAVE

Microextração adsortiva em barra (BA μ E)

Técnicas de microextração sortiva

Compostos emergentes

Fases sorventes

Matrizes reais

ABSTRACT

Several classes of emerging organic compounds present high risk of toxicity to the public and environmental health, and due to their continuous input into the environment by humans, many international institutions have been elaborating regulatory guidelines for interdiction, control and monitoring.

Therefore, the present thesis proposes the application of the innovative bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique, which operates in static mode under the flotation sampling technology, for monitoring trace levels of several classes of emerging compounds, including fungicides, benzophenones, insecticide repellents, parabens, pharmaceuticals and sexual steroid hormones in different types of real matrices. Consequently, several new analytical methodologies were developed through BA μ E, using selective sorbent phases (polymers and nanostructured materials), followed by back-extraction through liquid desorption (LD) combined with chromatographic and hyphenated techniques, in which the analytical procedures were optimized, validated and applied to environmental, food, biological and commercial products samples.

During the experimental implementation, improvements were introduced in the microextraction stage, through the reduction of the size of the analytical device and the available amount of the sorbent phase, as well as in the back-extraction stage, using only one single step through the simultaneously reduction of the solvent volume at the microliters level more compatible with the analytical instrumentation. From the results obtained, the methodologies developed demonstrated excellent analytical performance having high selectivity and sensitivity in the ppb's to ppt's range, showing to be effective alternatives for monitoring emerging compounds, in comparison with other sorption-based microextraction techniques.

In short, the present work demonstrates that BA μ E is a reproducible analytical tool, cost-effective and compatible with the principles of green analytical chemistry, of easy and rapid implementation for monitoring trace levels of emerging compounds from matrices with high complexity and diverse source.

KEYWORDS

Bar adsorptive microextraction (BA μ E)

Sorptive microextraction techniques

Emerging compounds

Sorbent phases

Real matrices

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**Abreviaturas**

| | |
|-----------------|--|
| AC | Carvão ativado |
| AcEt | Acetato de etilo |
| ACN | Acetonitrilo |
| A μ E | Microextração adsortiva |
| AZO | Azoxistrobina |
| <i>b</i> | Fenómeno de <i>breakthrough</i> |
| BA μ E | Microextração adsortiva em barra |
| BPF | Benzofenona |
| BEN | Benalaxil |
| BP | Butilparabeno |
| C | Carbono |
| CAR | <i>Carbowax</i> |
| CAR/PDMS | <i>Carbowax</i> /polidimetilsiloxano |
| CE | Eletroforese capilar |
| <i>cis</i> | Isómero geométrico <i>cis</i> |
| Cl | Cloro |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CYP | Ciprodinil |
| Da | Dalton |
| DAD | Detetor por rede de díodos |
| DEET | <i>N,N</i> -dietil- <i>meta</i> -toluamida |
| DHB | 2, 4-hidroxibenzofenona |
| DIC | Diclofenaco |
| DIF | Difenoconazol |
| DP | Desvio padrão |
| DVB | Divinilbenzeno |
| DVB/PDMS | Divinilbenzeno/polidimetilsiloxano |
| DVB/CAR | Divinilbenzeno/ <i>carbowax</i> |

| | |
|--------------------------------|--|
| EDCs | Químicos desreguladores endócrinos |
| 17 α -EE | 17 α -Ethinilestradiol |
| EG-PDMS | Etilenoglicol-polidimetilsiloxano |
| EP | Etilparabeno |
| α -EST | 17 α -Estradiol |
| β -EST | 17 β -Estradiol |
| EST | Estriol |
| ETARs | Estações de tratamento de águas residuais |
| ETR | Estrona |
| EUA | Estado Unidos da América |
| F | Flúor |
| FLU | Flusilazol |
| FE | Fase estacionária |
| FM | Fase móvel |
| FS | Varrimento contínuo ou <i>full-scan</i> |
| FUR | Furosemida |
| GC | Cromatografia em fase gasosa |
| GC-MS | Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa |
| GSC | Cromatografia gás-sólido |
| GLC | Cromatografia gás-líquido |
| GPE | Extração em fase de goma |
| H ₂ O | Água |
| H ₃ PO ₄ | Ácido orto-fosfórico |
| HBP | 4-Hidroxibenzofenonna |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HMB | 2-Hidroxi-4-metoxi-benzofenona |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| HPLC-DAD | Cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por rede de díodos |
| HPLC-MS | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espetrometria de massa |

| | |
|--------------|---|
| HS | Espaço de cabeça |
| HS-SBSE | Extração sortiva em barra de agitação no espaço de cabeça |
| HS-SPME | Microextração em fase sólida no espaço de cabeça |
| IEC | Cromatografia de troca iônica |
| KET | Cetoprofeno |
| LC | Cromatografia líquida |
| LC-MS | Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa |
| μLD | Microdessorção líquida |
| LD | Dessorção líquida |
| LD-CE | Dessorção líquida seguida de eletroforese capilar |
| LD-GC | Dessorção líquida seguida de cromatografia em fase gasosa |
| LD-HPLC | Dessorção líquida seguida de cromatografia líquida de alta eficiência |
| LLC | Cromatografia líquido-líquido |
| LLE | Extração líquido-líquido |
| LOD | Limite de detecção |
| LOQ | Limite de quantificação |
| LSC | Cromatografia líquido-sólido |
| LVI | Injeção de grandes volumes |
| MEB | Mebeverina |
| MEF | Ácido mefenâmico |
| MeOH | Metanol |
| MEPS | Microextração por sorventes empacotados |
| MES | Mestranol |
| MET | Metalaxil |
| MP | Metilparabeno |
| MS | Espectrometria de massa |
| MSAμE | Microextração adsorptiva em multiesferas |
| MYC | Miclobutanil |
| <i>n</i> -C5 | Pentano |
| <i>n</i> -C6 | Hexano |

| | |
|--------|---|
| N | Azoto |
| Na | Sódio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NAP | Naproxeno |
| NSAID | Anti-inflamatórios não esteroides |
| 19-NOR | 19-Nortisterona |
| NOR | D-(-)-Norgestrel |
| O | Oxigénio |
| OTT | Armadilha em tubo aberto |
| P | Polímero |
| PA | Poliacrilato |
| PC | Cromatografia em papel |
| PDMS | Polidimetilsiloxano |
| PEN | Penconazol |
| PERM | Permetrina |
| PP | Propilparabeno |
| PPCPs | Produtos farmacêuticos de higiene e cuidado pessoal |
| PPP | Polipropileno |
| PROC | Procimidona |
| PRO | Progesterona |
| PS-DVB | Poliestireno-divinilbenzeno |
| PU | Poliuretano |
| PTV | Vaporização com temperatura programada |
| RSD | Desvio padrão relativo |
| RU | Reino Unido |
| S | Enxofre |
| SAM | Método da adição de padrão |
| SBSE | Extração sortiva em barra de agitação |
| SEC | Cromatografia de exclusão molecular |
| Si | Silício |

| | |
|----------------|--|
| SIM | Monitorização de iões seleccionados |
| S/N | Razão sinal/ruído |
| SPE | Extração em fase sólida |
| SPME | Microextração em fase sólida |
| TD | Dessorção térmica |
| TD/GC-MS | Dessorção térmica seguida de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa |
| TDU | Unidade de dessorção térmica |
| TEB | Tebuconazol |
| TLC | Cromatografia em camada fina |
| <i>trans</i> | Isómero geométrico <i>trans</i> |
| U | Urina |
| U _p | Urina de mulher grávida |
| UV | Ultravioleta |
| UV-A | Raios ultravioleta do tipo A |
| UV-B | Raios ultravioleta do tipo B |
| UV-C | Raios ultravioleta do tipo C |
| UV-vis | Ultravioleta e visível |
| vis | Visível |

Símbolos

| | |
|------------------------|--|
| α | Seletividade |
| β | Razão de fases |
| λ | Comprimento de onda |
| $\lambda_{\text{máx}}$ | Comprimento de onda de absorção máximo |
| π | Pi |
| % | Percentagem |
| \neq | Diferentes |
| \approx | Aproximadamente |
| < | Inferior |

| | |
|-------------|--|
| > | Superior |
| Å | 10^{-10} m |
| °C | Graus Celcius |
| °C/min | Graus Celcius por min |
| µA | Microampere |
| µg | Microgramas |
| µg/g | Micrograma por grama |
| µg/mg | Micrograma por miligrama |
| µg/L | Micrograma por litro |
| µL | Microlitros |
| µL/min | Microlitros por minuto |
| µm | Micrómetros |
| $[X]_{in}$ | Concentração do analito na amostra inicial |
| $[X]_{out}$ | Concentração do analito na amostra final |
| $[X]_S$ | Concentração do analito X na amostra |
| $[X]_{SP}$ | Concentração do analito X na fase sorvente |
| $[X]_{FE}$ | Concentração do analito X na fase estacionária |
| $[X]_{FM}$ | Concentração do analito X na fase móvel |
| bar | Unidade de pressão |
| C_0 | Concentração inicial do analito na amostra |
| C_8 | Octil |
| C_{18} | Octadecil |
| C_{SBSE} | Concentração do analito no PDMS |
| C_W | Concentração do analito na fase aquosa |
| cm | Centímetros |
| eV | Eletrão-volt |
| g/L | Grama por litro |
| h | Hora |
| H | Hidrogénio |
| H | Altura equivalente a um prato teórico |
| k' | Fator de capacidade |

| | |
|----------------|--|
| K | Coeficiente de partição |
| K_{fs} | Coeficiente de partição do analito |
| $K_{O/W}$ | Coeficiente de partição octanol-água |
| $K_{PDMS/W}$ | Coeficiente de partição PDMS-água |
| L | Litro |
| Log | Logaritmo de base decimal |
| L | Comprimento da coluna |
| m_0 | Quantidade inicial de analito na amostra aquosa |
| m | Metro |
| M | Molar |
| m^2/g | Metro quadrado por grama |
| mg | Miligrama |
| mg/g | Miligrama/grama |
| mg/L | Miligramas por litro |
| min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| mL/min | Mililitros por minuto |
| mm | Milímetros |
| ms | Milisegundo |
| m/v | Massa/volume |
| m/z | Razão massa/carga |
| m_{SBSE} | Massa de analito na fase de PDMS |
| m_W | Massa de analito na fase aquosa |
| n | Massa de analito extraído |
| N | Números de pratos teóricos |
| ng/L | Nanogramas por litro |
| nm | Nanómetros |
| p | Peso |
| pH | Escala logarítmica decimal da concentração em hidrogeniões |
| $pH_{amostra}$ | pH da amostra |
| pH_{PZC} | pH do ponto de carga zero |

| | |
|------------|---|
| pK_a | Escala logarítmica decimal da constante de acidez |
| p/p | Peso por peso |
| ppm | Partes-por-milhão |
| ppb | Partes-por-bilião |
| ppt | Partes-por-trilião |
| psi | Unidade de pressão |
| p/v | Peso por volume |
| r^2 | Coeficiente de determinação |
| rpm | Rotações por minuto |
| R_s | Resolução |
| s | Segundo |
| t_M | Tempo morto |
| t_R | Tempo de retenção |
| t_R' | Tempo de retenção ajustado |
| v | Volume |
| v/v | Volume por volume |
| V_f | Volume do sorvente |
| V_{SBSE} | Volume de PDMS |
| V_w | Volume da amostra |
| W | Largura na base dum pico |
| $W_{1/2}$ | Largura dum pico a meia altura |

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|--------------|
| Prefácio | v |
| Agradecimentos | ix |
| Resumo | xi |
| Palavras-chave | xii |
| Abstract | xiii |
| Keywords | xiv |
| Abreviaturas e Símbolos | xv |
| Índice Geral | xxiii |
| Índice de Figuras | xxix |
| Índice de Tabelas | xxxv |
| | |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Considerações Gerais | 3 |
| 1.2. Métodos de Análise Química | 6 |
| 1.3. Etapa de Preparação de Amostras | 8 |
| 1.4. Técnicas de Amostragem Analítica | 10 |
| 1.5. Referências | 13 |
| | |
| 2. Técnicas de Microextração Sortiva | 17 |
| 2.1. Considerações Gerais | 19 |
| 2.2. Extração em Fase Sólida (SPE)..... | 19 |
| 2.3. Microextração em Fase Sólida (SPME) | 21 |
| 2.4. Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE)..... | 24 |
| 2.5. Microextração Adsorbtiva (A μ E) | 29 |
| 2.5.1. Configurações geométricas dos dispositivos | 30 |
| 2.5.2. Características das fases sorventes | 31 |
| 2.5.3. Método de desenvolvimento analítico da BA μ E..... | 33 |
| 2.5.4. Validação e aplicação da BA μ E..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6. Referências | 37 |
| 3. Objetivos da Tese | 41 |
| 3. Objetivos da Tese..... | 43 |
| 4. Parte Experimental..... | 45 |
| 4.1. Reagentes Químicos | 47 |
| 4.1.1. Padrões analíticos..... | 47 |
| 4.1.1.1. Fungicidas | 47 |
| 4.1.1.2. Benzofenonas..... | 47 |
| 4.1.1.3. Inseticidas repelentes | 47 |
| 4.1.1.4. Parabenos | 47 |
| 4.1.1.5. Fármacos | 48 |
| 4.1.1.6. Hormonas..... | 48 |
| 4.1.2. Reagentes..... | 48 |
| 4.2. Material Corrente e Equipamento de Laboratório | 49 |
| 4.3. Fases Sorventes Usadas em Microextração..... | 50 |
| 4.3.1. Ensaios com fungicidas..... | 50 |
| 4.3.2. Ensaios com benzofenonas | 51 |
| 4.3.3. Ensaios com inseticidas repelentes | 51 |
| 4.3.4. Ensaios com parabenos..... | 52 |
| 4.3.5. Ensaios com fármacos | 53 |
| 4.3.6. Ensaios com hormonas..... | 53 |
| 4.4. Amostras | 54 |
| 4.4.1. Ensaios com fungicidas..... | 55 |
| 4.4.2. Ensaios com benzofenonas | 55 |
| 4.4.3. Ensaios com inseticidas repelentes | 55 |
| 4.4.4. Ensaios com parabenos..... | 56 |
| 4.4.5. Ensaios com fármacos | 56 |
| 4.4.6. Ensaios com hormonas..... | 57 |
| 4.5. Procedimento Experimental..... | 58 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5.1. Preparação das soluções de trabalho | 58 |
| 4.5.2. Condições de operação instrumental | 58 |
| 4.5.3. Determinação do pH_{PZC} | 60 |
| 4.5.4. Preparação dos dispositivos para microextração - BA μ E | 61 |
| 4.5.5. Procedimento para extração..... | 61 |
| 4.5.6. Procedimento para retroextração | 62 |
| 4.5.7. Validação das metodologias..... | 62 |
| 4.5.8. Aplicação a matrizes reais..... | 63 |
| 4.6. Referências | 63 |
| 5. Comparação da Seletividade de Diferentes Fases Sorventes para Microextração Adsorptiva em Barra - Aplicação na análise vestigial de fungicidas em matrizes reais [1]. | 65 |
| 5.1. Nota Introdutória | 67 |
| 5.2. Resultados e Discussão | 70 |
| 5.2.1. Condições de operação instrumental | 70 |
| 5.2.2. Otimização da eficiência da BA μ E-LD | 71 |
| 5.2.2.1. Seleção do material sorvente..... | 72 |
| 5.2.2.2. Estudo dos parâmetros da LD | 74 |
| 5.2.2.3. Estudo dos parâmetros da BA μ E(P3) | 76 |
| 5.2.3. Validação da metodologia BA μ E(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM) | 79 |
| 5.2.4. Aplicação da metodologia BA μ E(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM) a matrizes reais | 82 |
| 5.3. Conclusões | 84 |
| 5.4. Referências | 85 |
| 6. Determinação Vestigial de Filtros UV do Tipo Benzofenona em Matrizes Reais por Microextração Adsorptiva em Barra Usando Fases Sorventes Seletivas [1]. 91 | |
| 6.1. Nota Introdutória | 93 |
| 6.2. Resultados e Discussão | 95 |
| 6.2.1. Condições de operação instrumental | 95 |
| 6.2.2. Seleção das fases de revestimento para a BA μ E | 96 |

| | |
|--|------------|
| 6.2.2.1. Caracterização dos materiais sorventes | 97 |
| 6.2.2.2. Seletividade dos materiais sorventes..... | 97 |
| 6.2.3. Otimização da eficiência da BAμE(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)..... | 100 |
| 6.2.3.1. Estudo dos parâmetros da LD(1,5 mL) | 100 |
| 6.2.3.2. Estudo dos parâmetros da BAμE(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)..... | 102 |
| 6.2.4. Validação da metodologia BAμE(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD | 105 |
| 6.2.5. Aplicação das metodologias BAμE(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD a matrizes reais | 109 |
| 6.3. Conclusões..... | 111 |
| 6.4. Referências | 112 |
| 7. Melhoramento da Técnica de Microextração Adsorativa em Barra (BAμE) - Aplicação na determinação de inseticidas repelentes em matrizes reais [1] .. | 117 |
| 7.1. Nota Introdutória..... | 119 |
| 7.2. Resultados e Discussão | 121 |
| 7.2.1. Condições de operação instrumental | 121 |
| 7.2.2. Otimização da eficiência da BAμE-μLD(200 μL) | 123 |
| 7.2.2.1. Seleção dos materiais sorventes para a BAμE-μLD(200 μL) | 123 |
| 7.2.2.2. Seletividade dos materiais sorventes..... | 124 |
| 7.2.2.3. Melhoramentos e otimização da retroextração | 127 |
| 7.2.2.4. Otimização da BAμE(AC2, 1,7 mg) | 129 |
| 7.2.3. Validação da metodologia BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/LVI-GC-MS(SIM) | 132 |
| 7.2.4. Melhoramentos no dispositivo analítico - Redução da BAμE | 135 |
| 7.2.5. Aplicação da metodologia BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/LVI-GC-MS(SIM) a matrizes reais | 136 |
| 7.3. Conclusões..... | 137 |
| 7.4. Referências | 138 |

| | |
|--|------------|
| 8. Determinação de Níveis de Concentração de Parabenos em Matrizes Reais por Microextração Adsorativa em Barra (BAμE) Usando Fases Sorventes Seletivas [1] | 143 |
| 8.1. Nota Introdutória | 145 |
| 8.2. Resultados e Discussão | 147 |
| 8.2.1. Condições de operação instrumental | 147 |
| 8.2.2. Caracterização das fases sorventes para BA μ E | 148 |
| 8.2.3. Seletividade das fases sorventes | 149 |
| 8.2.4. Otimização da eficiência da BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L) | 152 |
| 8.2.4.1. Estudo do efeito dos parâmetros da μ LD(200 μ L) | 152 |
| 8.2.4.2. Estudo do efeito dos parâmetros da BA μ E(AC2, 1,7 mg) | 154 |
| 8.2.5. Validação da metodologia BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD | 156 |
| 8.2.6. Aplicação da metodologia BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD a matrizes reais | 160 |
| 8.3. Conclusões | 164 |
| 8.4. Referências | 164 |
| 9. Avanços na Técnica de Microextração Adsorativa em Barra - Aplicação na determinação de fármacos em matrizes reais [1] | 169 |
| 9.1. Nota Introdutória | 171 |
| 9.2. Resultados e Discussão | 174 |
| 9.2.1. Condições de operação instrumental | 174 |
| 9.2.2. Estudo da eficiência da BA μ E- μ LD(100 μ L) | 175 |
| 9.2.2.1. Caracterização das fases sorventes | 175 |
| 9.2.2.2. Seletividade das fases sorventes | 176 |
| 9.2.2.3. Estudo do efeito dos parâmetros da μ LD | 179 |
| 9.2.2.4. Estudo do efeito dos parâmetros da BA μ E(P5, 0,9 mg) | 182 |
| 9.2.3. Validação da metodologia BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD | 185 |
| 9.2.4. Aplicação da metodologia BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD a matrizes reais | 188 |
| 9.3. Conclusões | 191 |
| 9.4. Referências | 192 |

| | |
|--|------------|
| 10. Determinação de Níveis de Hormonas Esteróides Sexuais em Matrizes Reais por Microextração Adsorativa em Barra (BAμE) [1] | 197 |
| 10.1. Nota Introdutória | 199 |
| 10.2. Resultados e Discussão | 202 |
| 10.2.1. Condições de operação instrumental | 202 |
| 10.2.2. Estudo da eficiência da BA μ E- μ LD(100 μ L) | 203 |
| 10.2.2.1. Caracterização das fases sorventes | 204 |
| 10.2.2.2. Seletividade das fases sorventes | 204 |
| 10.2.2.3. Estudo do efeito dos parâmetros da μ LD(100 μ L) | 208 |
| 10.2.2.4. Estudo do efeito dos parâmetros da BA μ E(P2, 1,3 mg) | 209 |
| 10.2.3. Validação da metodologia BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD | 213 |
| 10.2.4. Aplicação da metodologia BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD a matrizes reais | 216 |
| 10.3. Conclusões | 220 |
| 10.4. Referências | 221 |
| 11. Conclusões Finais e Perspetivas Futuras | 225 |
| 11. Conclusões Finais e Perspetivas Futuras | 227 |
| Anexo | 231 |
| Anexo 1 | 233 |
| A.1. Técnicas cromatográficas | 233 |
| A.1.1. Breve nota histórica | 233 |
| A.1.2. Conceitos teóricos fundamentais | 234 |
| A.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) | 238 |
| A.1.4. Cromatografia em fase gasosa (GC) | 241 |
| A.1.5. Cromatografia em fase gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) | 243 |
| A.2. Referências | 245 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Esquema analítico genericamente usado em métodos que envolvem técnicas de preparação de amostras e análise cromatográfica..... | 8 |
| 1.2 | Ilustração que descreve os modos de amostragem dinâmica (a) e estática (b) . | 11 |
| 1.3 | Diagrama que resume os métodos de microextração sortivos mais vulgarmente usados em análise vestigial, de acordo com o tipo de matrizes e analitos envolvidos e as técnicas de amostragem analítica disponíveis [21] | 13 |
| 2.1 | Imagem exemplificativa de um cartucho de SPE | 20 |
| 2.2 | Imagem exemplificativa de um dispositivo de SPME | 22 |
| 2.3 | Imagem exemplificativa de um dispositivo de SBSE | 24 |
| 2.4 | Comparação da recuperação de SBSE (PDMS, 126 μ L) e SPME (PDMS, 0,5 μ L) em função do log K_{OW} , em condições experimentais idênticas | 26 |
| 2.5 | Esquema ilustrando os modos de operação relativos à extração (a) e retroextração (b) usados pela técnica de SBSE. Legenda: 1 - Frasco de amostragem; 2 - HS; 3 - <i>Vortex</i> ; 4 - Amostra; 5 - Barra de agitação magnética em Teflon; 6 - Dispositivo de SBSE; 7 - Vial; 8 - Solvente para LD; 9 - Tubo de vidro para TD [1]..... | 27 |
| 2.6 | Diagrama que ilustra as possíveis estratégias analíticas para análise por SBSE(PDMS) de acordo com a polaridade dos compostos orgânicos envolvidos e os sistemas instrumentais compatíveis [1] | 29 |
| 2.7 | Imagens ilustrativas da BA μ E (a) revestida com ACs (1) e PS-DVB (2), e da MSA μ E (b) revestida com PS-DVB (1) e ACs (2) | 30 |
| 2.8 | Representação esquemática da constituição do dispositivo de BA μ E [1]..... | 32 |
| 2.9 | Esquema e imagem exemplificando os modos de operação da microextração por flutuação (a) e retroextração por LD (b) usados na técnica BA μ E. Legenda: 1 - Frasco de amostragem; 2 - <i>Vortex</i> ; 3 - Amostra; 4 - Barra de agitação magnética em Teflon; 5 - Dispositivo de BA μ E; 6 - Vial; 7 - Solvente para LD [1] | 34 |
| 2.10 | Diagrama resumo que ilustra o procedimento analítico genérico usado nas técnicas de microextração sortiva. O fundo cinzento claro indica os modos de operação da BA μ E..... | 37 |
| 5.1 | Estruturas químicas dos dez fungicidas modelo estudados no presente estudo. | 69 |
| 5.2 | Recuperação média obtida com fases sorventes e técnicas diferentes para os dez fungicidas em estudo, por BA μ E-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM). Condições - extração: 25 mL (0,8 μ L), 700 rpm, 4 h, pH 5,5; LD: 1,5 mL, ACN, 15 min de tratamento ultrassónico..... | 73 |
| 5.3 | Efeito do solvente na retroextração da BA μ E(P3). Condições - extração: 25 mL (0,8 μ L) 700 rpm, 4 h, pH 5,5; LD: 1,5 mL, 15 min de tratamento ultrassónico... | 75 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 5.4 | Efeito do tempo de extração na eficiência da BAμE(P3). Condições - extração: 25 mL (0,8 μg/L), 700 rpm, pH 5,5; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 minutos de tratamento ultrassônico | 77 |
| 5.5 | Efeito da velocidade de agitação na eficiência da BAμE(P3). Condições - extração: 25 mL (0,8 μg/L), 4 h, pH 5,5; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 minutos de tratamento ultrassônico | 77 |
| 5.6 | Efeito do pH na eficiência da BAμE(P3). Condições - extração: 25 mL (0,8 μg/L), 1000 rpm, 4 h; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 minutos de tratamento ultrassônico | 78 |
| 5.7 | Efeito da força iônica na eficiência da BAμE(P3). Condições - extração: 25 mL (0,8 μg/L), 1000 rpm, 4 h; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 minutos de tratamento ultrassônico | 79 |
| 5.8 | Fragmentograma resultante de ensaio de recuperação a 0,8 μg/L, obtido por BAμE(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM) sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-MET, 2-CYP, 3-PEN, 4-PROC, 5-FLU, 6-MYC, 7-BEN, 8-TEB, 9-DIF, 10-AZO | 81 |
| 5.9 | Fragmentograma resultante dos ensaios em vinho branco, obtido por BAμE(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM) sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-MET, 2-CYP | 84 |
| 6.1 | Estruturas químicas das quatro benzofenonas selecionados para o presente estudo..... | 95 |
| 6.2 | Recuperação média obtida com diferentes Ps (a) e ACs (b) para os quatro filtros UV em água ultrapura por BAμE-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, em condições experimentais padrão. Condições - extração: 25 mL (8,0 μg/L), 1000 rpm, 2 e 16 h, pH 5,5; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassônico | 99 |
| 6.3 | Efeito do solvente (a) e do tempo no ultrassons (b) na retroextração da BAμE(P2 e AC4). Condições - (a) extração: 25 mL (8,0 μg/L), 2 h (P2) e 16 h (AC4), 1000 rpm, pH 5,5; LD: 1,5 mL, 30 min de tratamento ultrassônico; (b) extração: 25 mL (8,0 μg/L), 2 h (P2) e 16 h (AC4), 1000 rpm, pH 5,5; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v) | 101 |
| 6.4 | Efeito do tempo de extração (a) e pH (b) na eficiência da BAμE(P2 e AC4). Condições - (a) extração: 25 mL (8,0 μg/L), 1000 rpm, pH 5,5; LD: 1,5 mL ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 (P2) e 30 (AC4) min de tratamento ultrassônico; (b) extração: 25 mL (8,0 μg/L), 1000 rpm, 2 h (P2) e 16 h (AC4), pH 5,5; LD: 1,5 mL ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 (P2) e 30 (AC4) min de tratamento ultrassônico | 103 |
| 6.5 | Cromatograma resultante de um ensaio de recuperação (8,0 μg/L) obtido por BAμE(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-HBP, 2-DHB, 3-BPF, 4-HMB..... | 108 |
| 6.6 | Cromatogramas resultante dos ensaios em aftershave (a) e protetor solar (b), obtido por BAμE-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas | 111 |
| 7.1 | Estruturas químicas dos inseticidas selecionados para o presente estudo | 121 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 7.2 | Recuperação média obtida com diferentes ACs (a) e Ps (b) para os inseticidas em estudo em água ultrapura por BAμE-μLD(200 μL)/LVI-GC-MS(SIM), em condições experimentais padrão. Condições - extração: 25 mL (1,0 μg/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μLD: 200 μL, ACN, 30 min de tratamento ultrassônico | 126 |
| 7.3 | Imagem que mostra o processo de μLD para BAμE(AC2, 1,7 mg) (a) e BAμE(AC2, 0,9 mg) (b) | 128 |
| 7.4 | Efeito do solvente na retroextração da BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/LVI-GC-MS(SIM). Condições - extração: 25 mL (1,0 μg/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μLD: 200 μL, 15 min de tratamento ultrassônico | 128 |
| 7.5 | Efeito do tempo de extração (a) e pH (b) na eficiência da BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/LVI-GC-MS(SIM). Condições - (a) extração: 25 mL (1,0 μg/L), 1000 rpm, pH 5,5; μLD: 200 μL ACN, 15 min ultrassons; (b) extração: 25 mL (1,0 μg/L), 1000 rpm, 16 h; μLD: 200 μL ACN, 15 min de tratamento ultrassônico..... | 130 |
| 7.6 | Comparação da recuperação para os três inseticidas repelentes entre BAμE(AC2, 1,7 mg) e BAμE(AC2, 0,9 mg), seguido de μLD(200 μL)/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas | 134 |
| 7.7 | Fragmentograma resultante de ensaio de recuperação a 1,0 μg/L obtido por BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-DEET, 2- <i>cis</i> -PERM, 3- <i>trans</i> -PERM | 134 |
| 7.8 | Imagem que mostra a geometria da BAμE(AC2, 1,7 mg) (a) e da BAμE(AC2, 0,9 mg) (b) | 135 |
| 8.1 | Estruturas químicas dos quatro parabenos selecionados para o presente estudo | 147 |
| 8.2 | Recuperação média obtida com diferentes Ps (a) e ACs (b) para os parabenos em estudo em água ultrapura por BAμE-μLD(200 μL)/HPLC-DAD, em condições experimentais padrão. Condições - extração: 25 mL (8,0 μg/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μLD: 200 μL, MeOH, 30 min de tratamento ultrassônico | 151 |
| 8.3 | Efeito do solvente na retroextração da BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/HPLC-DAD. Condições - extração: 25 mL (1,0 μg/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μLD: 200 μL, 15 min de tratamento ultrassônico | 153 |
| 8.4 | Efeito do tempo de extração (a) e pH (b) na eficiência da BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/HPLC-DAD. Condições - (a) extração: 25 mL (8,0 μg/L), 1000 rpm, pH 5,5; μLD: 200 μL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 45 min de tratamento ultrassônico; (b) extração: 25 mL (8,0 μg/L), 1000 rpm, 16 h; μLD: 200 μL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 45 min de tratamento ultrassônico..... | 155 |
| 8.5 | Cromatograma referente a ensaio de recuperação a 8,0 μg/L obtido por BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-MP, 2-EP, 3-PP, 4-BP | 158 |
| 8.6 | Cromatograma referente à sobreposição dos ensaios efetuados ao creme de mãos e loção corporal, obtido pelo SAM por BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-MP, 2-EP, 3-PP, 4-BP | 163 |

| | | |
|------|--|-----|
| 9.1 | Estruturas químicas dos seis compostos farmacêuticos selecionados para o presente estudo..... | 173 |
| 9.2 | Recuperação média obtida com diferentes Ps (a), ACs (b) e comparação entre alguns sorventes (c), para os seis fármacos em estudo em água ultrapura por BAμE-μLD(100 μL)/HPLC-DAD, em condições experimentais padrão. Condições - extração: 25 mL (4,0 μg/L), 1000 rpm, 3 h para (a) e (b), 16 h para (c), pH 5,5; μLD: 100 μL, MeOH, 30 min de tratamento ultrassônico..... | 178 |
| 9.3 | Imagem ilustrativa usando 100 μL de solvente no passo de retroextração | 180 |
| 9.4 | Efeito do solvente na retroextração dos seis fármacos da BAμE(P5, 0,9 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD. Condições - extração: 25 mL (4,0 μg/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μLD: 100 μL, 30 min de tratamento ultrassônico | 181 |
| 9.5 | Efeito do tempo de extração (a) e pH (b) na eficiência de extração dos seis fármacos por BAμE(P5, 0,9 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD. Condições - (a) extração: 25 mL (4,0 μg/L), 1250 rpm, pH 5,5; μLD: 100 μL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 60 min de tratamento ultrassônico; (b) extração: 25 mL (4,0 μg/L), 1250 rpm, 3 h; μLD: 100 μL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 60 min de tratamento ultrassônico.... | 183 |
| 9.6 | Cromatograma referente ao ensaio de recuperação a 4,0 μg/L para os seis fármacos em estudo, obtido por BAμE(P5, 0,9 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-FUR, 2-MEB, 3-KET, 4-NAP, 5-DIC, 6-MEF | 186 |
| 9.7 | Cromatogramas parciais referentes aos ensaios não fortificados efetuados em água de mar, água residual #1 e em urina (U1), obtidos pelo SAM por BAμE(P5, 0,9 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas... | 190 |
| 10.1 | Estruturas químicas das nove hormonas selecionadas para o presente estudo | 201 |
| 10.2 | Recuperação média obtida com diferentes Ps (a) e ACs (b) para as nove hormonas em estudo em água ultrapura por BAμE-μLD(100 μL) /HPLC-DAD, em condições experimentais padrão. Condições - extração: 25 mL (6,0 μg/L), 1000 rpm, 3/16 h, pH 5,5; μLD: 100 μL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassônico | 207 |
| 10.3 | Efeito do solvente na retroextração da BAμE(P2, 1,3 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD em água ultrapura para as nove hormonas em estudo. Condições - extração: 25 mL (6,0 μg/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μLD: 100 μL, 30 min de tratamento ultrassônico | 209 |
| 10.4 | Efeito da velocidade de agitação na eficiência da microextração das nove hormonas em estudo em água ultrapura por BAμE(P2, 1,3 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD. Condições - extração: 25 mL (6,0 μg/L), 3 h, pH 5,5; μLD: 100 μL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassônico..... | 210 |
| 10.5 | Efeito do tempo de extração (a) e pH (b) na eficiência da microextração das nove hormonas em água ultrapura por BAμE(P2, 1,3 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD. Condições - (a) extração: 25 mL (6,0 μg/L), 1250 rpm, pH 5,5; μLD: 100 μL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassônico; (b) extração: 25 mL (6,0 μg/L), 1250 rpm, 3 h; μLD: 100 μL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassônico | 211 |

| | | |
|------|--|-----|
| 10.6 | Cromatograma referente a ensaio de recuperação em água ultrapura fortificada (6,0 µg/L), obtido por BAµE(P2, 1,3 mg)-µLD(100 µL)/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-EST, 2-β-EST, 3-α-EST, 4-19-NOR, 5-17α-EE, 6-ETR, 7-NOR, 8-PRO, 9-MES | 214 |
| 10.7 | Sobreposição de cromatogramas referentes aos ensaios não fortificados efetuados em água estuarina e água residual, obtidos pelo SAM por BAµE(P2, 1,3 mg)-µLD(100 µL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 2-β-EST, 5-17α-EE, 6-ETR | 219 |
| A1.1 | Ilustração do tempo morto (t_M), retenção ajustado (t_R') e do tempo de retenção (t_R) num cromatograma..... | 235 |
| A1.2 | Classificação dos métodos cromatográficos mais comuns..... | 238 |
| A1.3 | Ilustração simplificada de um sistema de HPLC | 239 |
| A1.4 | Ilustração simplificada de um sistema de GC..... | 242 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | | |
|-----|--|-----|
| 4.1 | Condições instrumentais usadas na análise dos analitos estudados por HPLC-DAD | 59 |
| 5.1 | Log K_{OW} , pK_a , iões e tempos de retenção (t_R), para os dez fungicidas em estudo obtidos por LVI-GC-MS(SIM) | 70 |
| 5.2 | Recuperação média, LODs, LOQs e resultados de calibração obtidos para o método BA μ E(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM) para os fungicidas em estudo, sob condições experimentais otimizadas..... | 80 |
| 5.3 | Ensaio de repetibilidade, expressos em recuperação média e precisão respetiva expressa em RSD, obtidas pelo método BA μ E(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM), para os fungicidas em estudo sob condições experimentais otimizadas | 82 |
| 5.4 | Declives e coeficientes de determinação obtidos através do SAM em matrizes reais para os fungicidas em estudo, pelo método BA μ E(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas | 83 |
| 6.1 | Log K_{OW} , pK_a , tempo de retenção (t_R), comprimento de onda ($\lambda_{m\acute{a}x}$) e coeficientes de determinação para as quatro benzofenonas em estudo obtidos por HPLC-DAD, sob condições instrumentais otimizadas..... | 96 |
| 6.2 | Recuperação média, LODs, LOQs e coeficientes de determinação obtidos para os filtros UV em estudo, através do método BA μ E(P2 e AC4)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas..... | 106 |
| 6.3 | Ensaio de repetibilidade expressos em recuperação média e precisão respetiva expressa em RSD, obtidos pelos métodos BA μ E(P2, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD e BA μ E(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, para as quatro benzofenonas em estudo sob condições experimentais otimizadas | 107 |
| 6.4 | Coeficientes de determinação e concentrações médias detetadas de filtros UV, obtidos através do SAM nas matrizes reais estudadas, pelos métodos BA μ E(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas..... | 110 |
| 7.1 | Classe, log K_{OW} , iões, tempos de retenção (t_R) e coeficientes de determinação para os inseticidas repelentes em estudo obtidos por LVI-GC-MS(SIM), sob condições instrumentais otimizadas..... | 123 |
| 7.2 | Recuperação média, LODs, LOQs, calibração e coeficientes de determinação obtidos para os inseticidas em estudo, através do método BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas..... | 133 |
| 7.3 | Declives e coeficientes de determinação obtidos para os inseticidas repelentes em estudo através do SAM nas matrizes reais estudadas, pelo método BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas..... | 137 |
| 8.1 | Log K_{OW} , pK_a , tempos de retenção (t_R), comprimento de onda máximo, limiares analíticos e coeficientes de determinação para os parabenos em estudo obtidos por HPLC-DAD, sob condições instrumentais otimizadas | 148 |

| | | |
|------|--|-----|
| 8.2 | Recuperação média, coeficiente de determinação e equação da calibração obtidos para os parabenos em estudo, através do método BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas | 157 |
| 8.3 | Recuperações médias e precisões (% ± RSD), obtidas nos ensaios de repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes por BAμE(AC2) seguida por μLD(200 μL)/HPLC-DAD para os quatro parabenos em estudo, sob condições experimentais otimizadas | 160 |
| 8.4 | Coeficientes de determinação (r^2) obtidos e níveis detetados (C_0) para os quatro parabenos através do SAM nas matrizes reais estudadas, pelo método BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas | 162 |
| 9.1 | Tipo de compostos, log K_{OW} , pK_a , tempos de retenção (t_R), comprimento de onda máximo ($\lambda_{m\acute{a}x}$), limiares analíticos (LODs e LOQs) e coeficientes de determinação (r^2) para os seis fármacos em estudo obtidos por HPLC-DAD, sob condições instrumentais otimizadas | 175 |
| 9.2 | Recuperação média, LODs, LOQs, gama de linear de concentrações e coeficientes de determinação (r^2) obtidos para os seis fármacos em estudo, através do método BAμE(P5, 0,9 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas | 186 |
| 9.3 | Recuperações médias e precisões (% ± RSD), obtidas nos ensaios de repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes por BAμE(P5, 0,9 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD para os seis fármacos em estudo, sob condições experimentais otimizadas | 187 |
| 9.4 | Coeficientes de determinação obtidos para os seis fármacos em estudo através do SAM nas matrizes reais estudadas, através de BAμE(P5, 0,9 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas..... | 189 |
| 10.1 | Log K_{OW} , pK_a , tempos de retenção (t_R), comprimento de onda máximo ($\lambda_{m\acute{a}x}$), limiares analíticos (LODs e LOQs) e coeficientes de determinação (r^2) para as nove hormonas em estudo obtidos por HPLC-DAD, sob condições instrumentais otimizadas | 203 |
| 10.2 | Recuperação média, limiares analíticos, gama linear dinâmica e coeficientes de determinação para as nove hormonas em estudo, através do método BAμE(P2, 1,3 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas... | 214 |
| 10.3 | Recuperações médias e precisões (% ± RSD), obtidas nos ensaios de repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes, em água ultrapura por BAμE(P2, 1,3 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD para as nove hormonas, sob condições experimentais otimizadas | 216 |
| 10.4 | Coeficientes de determinação e níveis de concentrações detetados para as nove hormonas em estudo obtidos através do SAM nas matrizes reais estudadas, através de BAμE(P2, 1,3 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas | 218 |

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As alterações climáticas, em particular o aquecimento global do planeta, são uma das consequências da libertação de inúmeros poluentes para o ambiente, nomeadamente, o dióxido de carbono, o qual tem captado a atenção da comunidade científica e política internacional. No entanto, muitos mais poluentes são libertados para o ecossistema que carecem de particular atenção e preocupação. A poluição, duma forma geral, pode ser definida como a introdução de substâncias químicas e/ou antropogénicas no ambiente, como resultado de diversas atividades. Hoje em dia, a preocupação relativa à poluição do ecossistema que nos rodeia é crescente, devido aos respetivos impactos que daí podem resultar tanto no ambiente como no Homem. Destas ações, resultam a presença de poluentes nos sistemas aquáticos e nos organismos, por vezes com níveis elevados, podendo levar a danos irreparáveis [1-4].

Na verdade, ao longo do último século, grandes quantidades de produtos químicos produzidos pelo Homem foram introduzidos no ambiente, seja por ação de processos industriais, armazenamento, manuseamento e transporte inadequado, má conduta no tratamento dos desperdícios, atividades urbanas e agrícolas. Os primeiros factos relativos à preocupação do ecossistema remontam ao ano de 1920, quando alguns cientistas relataram grande apreensão devido a alterações nas atividades agrícolas. Esta preocupação, advém do facto da passagem duma atividade agrícola sustentada e de produção natural, à implementação do uso de produtos químicos como forma de combater pragas ou doenças e, conseqüentemente, obter uma produção mais rentável economicamente [1, 2].

Uma vez a água ser parte integrante do ambiente e do planeta em que vivemos, esta preocupação torna-se redobrada, sendo que representa uma fonte essencial para a vida na Terra e o equilíbrio global de todo o ecossistema. Para o Homem, em particular, a qualidade da água é determinante para a sua sobrevivência e, para além da questão ecológica, a água tem igualmente importância ao nível económico. Todos os químicos libertados pelo Homem, vão ser dispersos no ambiente, seja por ação do vento ou dos cursos de água, para outras partes do planeta, transformando-se esta preocupação num problema

global. Muitos destes poluentes são persistentes no ambiente, e têm tendência para se acumularem nos animais e plantas, o que pode representar a entrada na cadeia alimentar do Homem e, conseqüentemente, causarem inúmeros problemas de saúde ambiental e humana. Como consequência de todos estes factos, o interesse nestas questões é prioritário, tendo vindo justamente a integrar as agendas ambientais e políticas mundiais [1, 4].

Em termos genéricos podemos afirmar que qualquer substância é tóxica a partir dum determinado nível de concentração. Da mesma forma, o conceito de que, tudo o que advém da natureza é saudável, ou o que é produzido pelo Homem é mau, está incorreta. Assim, qualquer organismo na presença dum micropolvente, não sendo responsável pela sua produção, é considerado um xenobiótico. Estas substâncias podem causar efeitos toxicológicos adversos, como resultado das interações físico-químicas com o organismo. Neste sentido, inúmera legislação tem sido elaborada por forma a controlar ou limitar a presença de determinadas substâncias dentro de níveis considerados inofensivos, isto é, inferior aos níveis toxicológicos, como por exemplo na água para consumo humano, alimentos, bebidas e em produtos farmacêuticos de higiene e cuidado pessoal (PPCPs) [1, 4].

Os micropoluentes podem ser igualmente designados de contaminantes emergentes, ou simplesmente micropoluentes emergentes, incluindo substâncias antropogénicas ou naturais. Nos micropoluentes emergentes, inserem-se os PPCPs, químicos industriais, pesticidas, entre muitos outros [5, 6].

Ao nível europeu, estima-se que o uso dos agroquímicos ultrapasse as 300.000 toneladas por ano, para proteção e tratamento das atividades agrícolas. Como exemplo, refira-se que a classe dos fungicidas usados no ano de 2010, dominou o mercado mundial em larga escala no que respeita aos pesticidas usados [5, 6]. Todos estes números demonstram de forma clara, o uso excessivo destas substâncias à escala europeia e mundial na atividade agrícola, o que sem os mesmos seguramente que representaria elevadas perdas económicas. Os pesticidas têm igualmente um papel preponderante no controlo e/ou eliminação de parasitas nos animais [7]. Os pesticidas são classificados como químicos desreguladores endócrinos (EDCs) e definidos como “agentes exógenos que

têm a capacidade de interferir com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação e eliminação de hormonas naturais no corpo, as quais são responsáveis pela manutenção da hemóstase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento” [8]. No ambiente, os efeitos dos pesticidas são adversos, sendo responsáveis por alterações ao nível da diferenciação sexual, malformações, feminização, perturbações do sistema imunitário, redução de fertilidade nas aves, peixes e mamíferos, assim como no desenvolvimento embrionário. Nos humanos, a exposição aos pesticidas pode levar a efeitos adversos diversificados, nomeadamente o desenvolvimento de tumores, problemas reprodutivos, Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, diabetes, envelhecimento, distúrbios cardíacos e renais, entre outros. A exposição a elevados níveis de pesticidas por trabalhadores rurais, já demonstrou igualmente um elevado risco para a tendência no ressurgimento de problemas neuropsiquiátricos, nomeadamente alterações de humor, depressão e ansiedade, bem como tendências suicidas e mortalidade, cujos factos continuam a despertar a preocupação na sociedade em geral [9-11].

Por outro lado, os PPCPs são, na atualidade, os micropoluentes emergentes com enorme impacto ao nível toxicológico no Homem e ambiente. O uso de alguns PPCPs remonta quase à origem da vida humana. O seu uso permitiu ao Homem aumentar o grau de higiene, evitando por vezes a ação prejudicial de diversos micro-organismos. Como consequência, a esperança de vida duplicou nos países desenvolvidos nos últimos dois séculos e as doenças infecciosas foram reduzidas consideravelmente. Os PPCPs têm vindo, igualmente, a ser reconhecidos como produtos com enorme significado e impacto ao nível ambiental. No grupo dos PPCPs, fazem parte um alargado conjunto de produtos químicos com ou sem prescrição médica, incluindo, fármacos, drogas veterinárias, suplementos alimentares, agentes de diagnóstico, bem como perfumes, *aftershave*, sabonetes, detergentes, protetores solares e cosméticos [12, 13]. Anualmente é reconhecido o uso exacerbado de PPCPs, que rondam as centenas de milhares de toneladas, em função do tratamento de perturbações nos humanos e animais [12]. Uma das origens destas substâncias no ambiente está associada ao facto do ser humano recorrer de forma rápida e excessiva à automedicação, sempre que “percorre” um momento de saúde débil

[13]. Consequentemente, a excreção dos mesmos pelos humanos na forma molecular parente ou metabolizada (toxicidade desconhecida) aumenta o risco de contaminação ambiental [14]. Outras fontes de PPCPs, têm principalmente origem em desperdícios, provenientes de aterros com origem veterinária, hospitalares, industriais e/ou domésticos [15]. No entanto, apesar do uso destas substâncias ter como objetivo o tratamento clínico, higiene, entre outros, diversos problemas têm aumentado de forma considerável, nomeadamente cancro, doenças cardíacas e diabetes, levando por vezes à morte. O aparecimento destas doenças poderá estar associado a diversas mudanças na sociedade, incluindo o uso de PPCPs e outros micropoluentes, ainda que por muito pequena que seja [13]. Como consequência, caso as ETARs não funcionem de forma eficaz na remoção de todas os compostos emergentes, estes serão posteriormente libertados descontroladamente para o meio aquático [5, 14].

Como resultado, a necessidade de desenvolver métodos alternativos de análise química, para monitorização de diversos compostos emergentes em matrizes reais é imperativa. Dum modo geral, as metodologias de análise química, exigem diversas etapas analíticas, constituídas por técnicas de preparação de amostras eficazes com posterior análise por técnicas cromatográficas e/ou hifenadas. O facto deste tipo de amostras apresentarem elevado grau de complexidade e a presença de níveis de poluentes à escala vestigial, podem condicionar, ou até mesmo dificultar, o desempenho de muitas metodologias analíticas propostas, nomeadamente na correspondente preparação das amostras [1-3].

1.2. MÉTODOS DE ANÁLISE QUÍMICA

O desenvolvimento de métodos de análise química é uma tarefa árdua, que requer dedicação e grande esforço. Genericamente, são constituídos por um processo integral que passa pela amostragem, preparação da amostra e análise dos analitos em estudo por técnicas instrumentais adequadas [13]. A deteção dos analitos em estudo por técnicas imunoquímicas é outra alternativa a ter em

conta, uma vez serem métodos rápidos, de baixo custo e sensíveis. No entanto, a grande desvantagem deve-se ao facto de serem pouco sensíveis e limitados na identificação dos compostos alvo [16]. Dado a maioria das amostras serem caracterizadas com elevada complexidade, o passo da preparação da amostra e posterior análise instrumental, é determinante para o sucesso analítico. Para além da complexidade das amostras, o maior desafio existente baseia-se nas características físico-químicas da generalidade dos micropoluentes emergentes. Apesar de existirem muitas semelhanças, por exemplo entre os PPCPs, existem igualmente diferenças significativas. Os PPCPs são concebidos para possuírem atividade biológica e características normalmente mais polares ($\log K_{OW} < 2,5$), contendo grupos funcionais ácidos e básicos, fazendo com que estes compostos sejam difíceis de ser retirados nas ETARs, e consequentemente do meio aquático. Uma vez os níveis de micropoluentes encontrados nas matrizes reais poderem variar desde os baixos ng/L até aos µg/L, são necessárias técnicas analíticas apropriadas para dar resposta aos teores vestigiais. Deste modo, nas técnicas de preparação de amostras pretende-se não só a extração seletiva dos analitos da matriz, mas também a limpeza e a concentração ou enriquecimento, permitindo baixar os limiares analíticos, e consequentemente, aumentar a sensibilidade dos métodos propostos [13, 15, 17, 18].

Atualmente, as técnicas de preparação de amostras a que normalmente se recorre, englobam a tradicional extração líquido-líquido (LLE), mas também as inovadoras técnicas de microextração sortiva, que para além de outras vantagens consomem quantidades de solventes orgânicos negligenciáveis. Destas últimas, destaca-se a extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME) e, mais recentemente, a extração sortiva em barra de agitação (SBSE). No que respeita às técnicas instrumentais normalmente usadas, recorre-se frequentemente à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), à cromatografia em fase gasosa (GC) e à eletroforese capilar (CE), usando detetores convencionais ou hifenadas à espectrometria de massa (MS) [5, 15, 17-20]. O anexo 1 apresenta uma breve descrição dos fundamentos e características mais importantes de algumas destas técnicas de análise instrumental.

1.3. ETAPA DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Desde a sua génese até aos dias de hoje, as técnicas cromatográficas e hifenadas, sofreram uma enorme evolução. A aplicação destas técnicas é vasta, relativamente às áreas científicas às quais dão resposta, sendo aptas para diversos tipos de amostras (sólidas, aquosas e gasosas) e compostos em questão (voláteis, semivoláteis e involáteis). No entanto, apesar do enorme desenvolvimento alcançado, ainda não é possível proceder à injeção direta da esmagadora maioria das amostras nos sistemas cromatográficos. A presença de substâncias ou partículas sólidas, e analitos que apresentam instabilidade térmica ou involatilidade para análise por GC e/ou HPLC, respetivamente, são alguns exemplos das dificuldades existentes. Entre as etapas normalmente executadas num esquema analítico, a preparação prévia da amostra é um passo crítico, determinante e limitativo, estando envolvidos igualmente, a amostragem mas também a introdução, separação e deteção dos analitos, como mostra a figura 1.1.

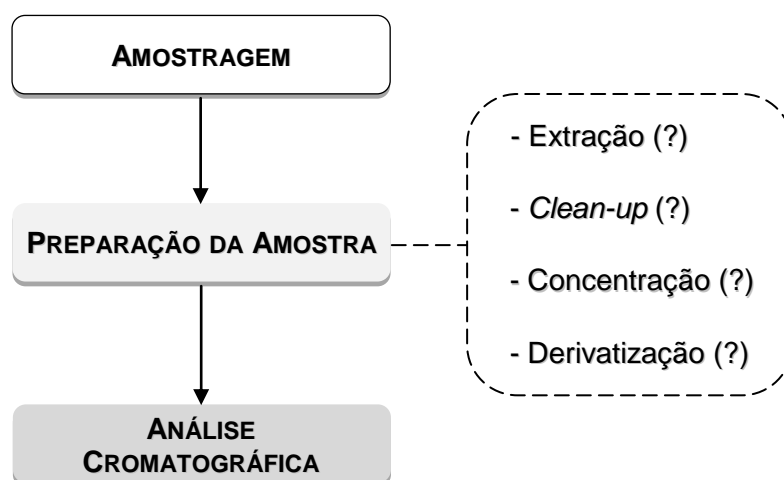


Figura 1.1 - Esquema analítico genericamente usado em métodos que envolvem técnicas de preparação de amostras e análise cromatográfica.

Ao recorrermos às técnicas de preparação de amostras, o principal objetivo é transferir os compostos com interesse da matriz original para outra fase mais apropriada para posterior implementação de técnicas de separação adequadas. Na prática, o funcionamento deste processo envolve,

fundamentalmente, a transferência dos analitos alvo para, dependendo dos casos, uma fase imiscível líquida ou sólida (com ou sem recurso a solventes orgânicos). A preparação da amostra não só limpa a matriz de eventuais interferentes, mas também isola e promove o enriquecimento dos analitos alvo presentes, sendo fundamentalmente importante quando na presença de matrizes com elevado grau de complexidade, como são o caso das amostras ambientais e biológicas. Igualmente decisiva, é o caso das amostras apresentarem níveis de analitos alvo em quantidades vestigiais, tornando-se muitas vezes impossível a análise direta por técnicas cromatográficas, promovendo ganhos de sensibilidade nesta etapa [21-26].

A posterior injeção e análise em sistemas cromatográficos (GC, HPLC, GC-MS e LC-MS), envolve o uso de uma parte ou a totalidade do extrato final. Nas últimas décadas, têm ocorrido enormes avanços nas técnicas de preparação de amostras, o que tem resultado numa evolução muito positiva. Por outro lado, há cada vez mais uma preocupação crescente no desenvolvimento de metodologias amigas do ambiente. Um dos caminhos consiste na redução considerável, ou mesmo eliminação, do uso de solventes orgânicos tóxicos, que têm levado ao ressurgimento de metodologias que reduzem à escala dos microlitros a quantidade de solvente usado, ou eliminem mesmo na sua totalidade, designadas por *solventless*. Toda esta evolução, vai ao encontro dos requisitos da química verde ou ambientalmente favorável. Neste sentido, as novas metodologias analíticas no que respeita à preparação de amostras, baseiam-se principalmente, na simplificação, miniaturização, facilidade na manipulação dos dispositivos, rapidez de execução, redução de custos e possibilidade de automatização, juntamente com a ausência ou quase eliminação do uso de solventes orgânicos tóxicos [21-26].

Apesar de já se encontrarem comercialmente disponíveis sistemas analíticos que integram a componente da preparação da amostra e separação cromatográfica, a automatização é igualmente um ponto-chave, uma vez que requer nestes casos específicos, ainda assim, a intervenção humana na preparação prévia da amostra. No entanto, pode afirmar-se que a componente dedicada à preparação das amostras, consome grande parte do tempo despendido por parte do operador, nas estratégias analíticas desenvolvidas para

a análise de amostras reais. Com esta evolução, as metodologias são cada vez mais eficazes, versáteis e capazes de substituir as técnicas convencionais [21, 22, 24-26].

1.4. TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM ANALÍTICA

Duma forma geral, a preparação da amostra consiste na transferência dos analitos com interesse para uma fase mais adequada à instrumentação analítica. Esta etapa é conseguida por intermédio do contacto direto da amostra com uma fase extrativa onde ocorre a respetiva transferência de massa. No entanto, para que esta etapa seja bem-sucedida, é importante selecionar a técnica mais adequada para essa tarefa, no que respeita ao enriquecimento, para posterior análise instrumental [21, 24].

Genericamente, as técnicas de amostragem analítica disponíveis podem operar nos modos estático e dinâmico. As técnicas de amostragem baseadas em processos dinâmicos, são caracterizadas pela amostra ser progressivamente forçada a passar por um dispositivo contendo uma fase extrativa, por intermédio de uma bomba de pressão ou através de vácuo. Esta é responsável não só pela limpeza da amostra e eliminação de interferentes, mas fundamentalmente pela retenção e concentração dos compostos com interesse. Após ficarem retidos, os analitos são eluídos da fase extrativa com recurso a solventes apropriados, que são posteriormente introduzidos na instrumentação analítica para a separação, identificação e quantificação. No caso das técnicas de amostragem que operam por processos estáticos, caracterizam-se pelo contacto imediato e completo duma fase extrativa com a amostra envolvida. Neste modo de enriquecimento, não ocorre renovação ou mudança de ambas as fases envolvidas, sendo o processo baseado no estabelecimento de um equilíbrio. Por forma a acelerar ou a facilitar a difusão de massa entre as fases e, conseqüentemente, a ocorrência do equilíbrio, recorre-se normalmente a agitação magnética, mecânica ou por intermédio de ultrassons [21]. A figura 1.2 ilustra ambos os modos de enriquecimento descritos, assim como as principais expressões que definem o fenómeno de enriquecimento dinâmico e estático.

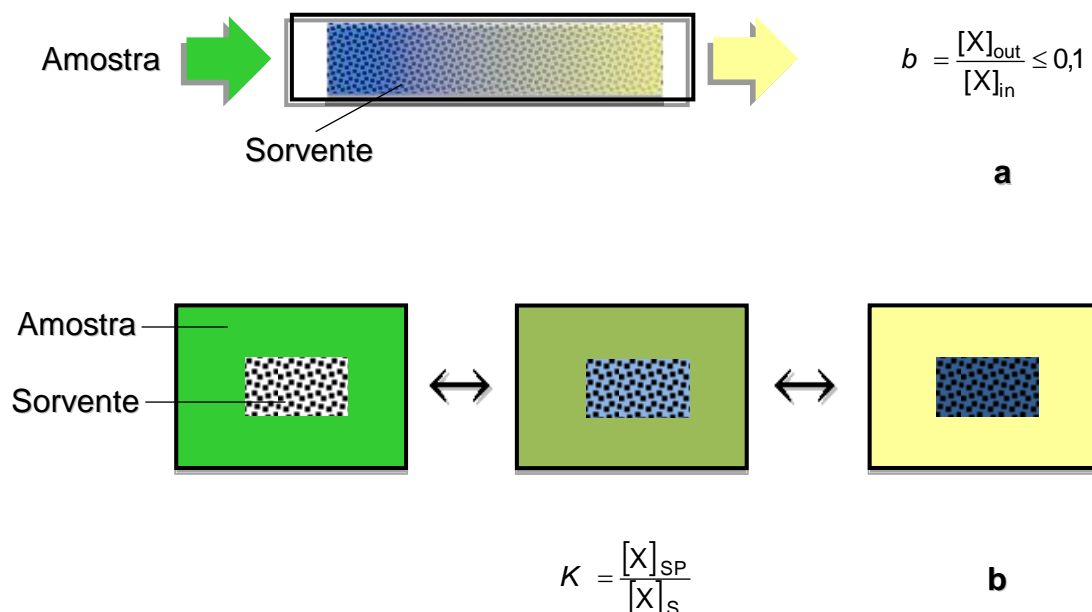


Figura 1.2 - Ilustração que descreve os modos de amostragem dinâmica (a) e estática (b).

No modo dinâmico (1.2.a), pode ocorrer o fenómeno de *breakthrough* (b), que se caracteriza pela ocorrência de saturação da fase extrativa, ou seja, o extratante ficar sem capacidade para reter mais analitos da amostra, facto que depende do volume de amostra a ser processada e/ou da sua complexidade. Neste sentido, para estarmos na presença de não saturação da fase extrativa, a razão das concentrações dos analitos na amostra inicial ($[X]_{in}$) e final ($[X]_{out}$), deve ser inferior a 0,1 [20]. Por outro lado, o modo estático (1.2.b), é baseado no equilíbrio ou distribuição do analito X entre a amostra ($[X]_S$) e a fase extrativa ($[X]_{SP}$), não sendo condicionado pelo fenómeno de *breakthrough*.

Como exemplo de técnicas que operam no modo dinâmico, destacam-se a extração em fase de goma (*gum phase extraction*, GPE), a armadilha em tubo aberto (*open tubular trapping*, OTT), a extração em fase sólida (*solid phase extraction*, SPE) e a microextração por sorventes empacotados (*microextraction by packed sorbent*, MEPS) recentemente introduzida. De todas estas, a SPE encontra-se perfeitamente estabelecida, sendo usada em rotina em inúmeros laboratórios analíticos [21, 24, 27]. Como exemplo de técnicas que operam no modo estático, podem salientar-se a extração líquido-líquido (LLE) no modo descontínuo, ou as técnicas baseadas em microextração, nomeadamente a microextração em fase sólida (SPME), a extração sortiva em barra de agitação

(SBSE), e mais recentemente, a microextração adsortiva (A μ E). A LLE, apesar de robusta e muito rotinada em laboratórios de ensaio, é uma técnica que se encontra em franco desuso, devido ao elevado consumo de solventes orgânicos tóxicos que exige e prejudiciais ao ambiente [21, 24, 27].

A extração estática tem sido o modo de amostragem que mais evoluiu nas últimas duas décadas, e que tem ganho espaço significativo na comunidade científica, mas também, em laboratórios de análises químicas. Algumas das vantagens do modo de extração estático, incluem a possibilidade de operar no modo de imersão (analitos semi-voláteis ou involáteis) e por espaço de cabeça (HS, analitos voláteis), assim como necessitarem de manipulação reduzida, e consequentemente, menor tempo despendido por parte do operador na preparação da amostra. Por outro lado, para além do volume de amostra utilizado poder ser reduzido, são sensíveis ao nível de traço e ultra-traço, reutilizáveis, robustas, de elevada repetibilidade e reprodutibilidade. Atualmente, a SPME e SBSE são as técnicas de microextração estática mais usadas e, como tal, serão desenvolvidas nas secções seguintes [21, 24-27]. A figura 1.3 ilustra um diagrama que resume os métodos de microextração sortivos mais frequentemente usados em análise vestigial, de acordo com o tipo de matrizes e analitos envolvidos e as técnicas de amostragem analítica disponíveis na atualidade.

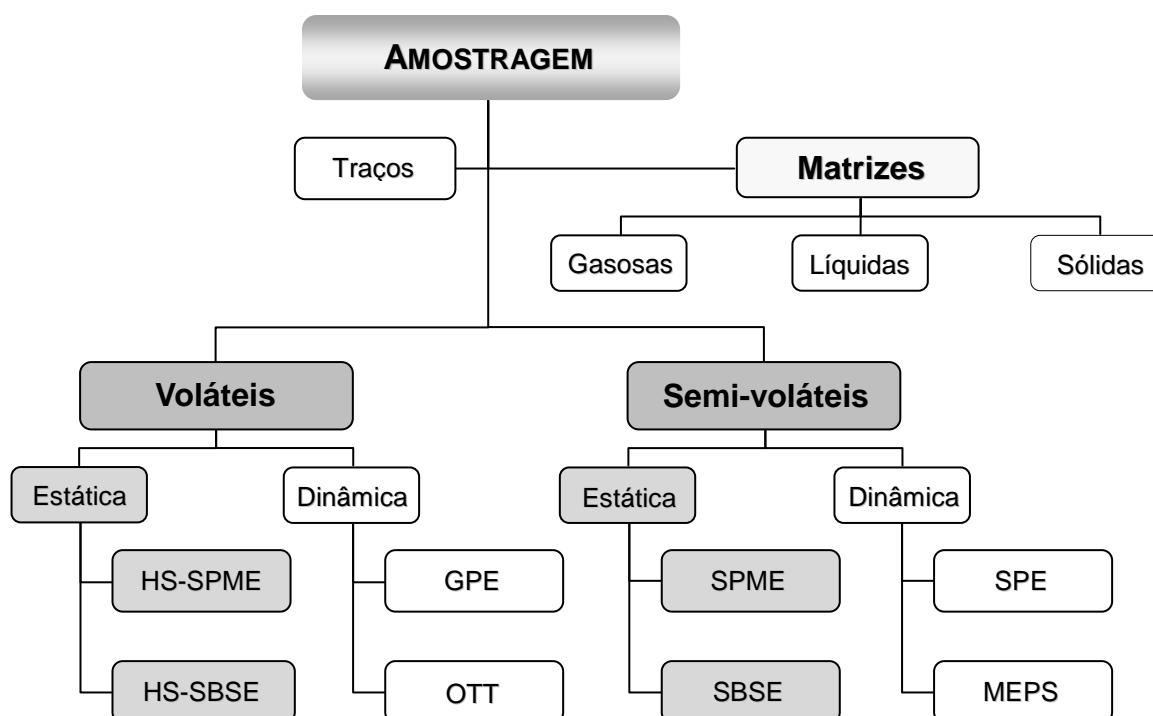


Figura 1.3 - Diagrama que resume os métodos de microextração sortivos mais vulgarmente usados em análise vestigial, de acordo com o tipo de matrizes e analitos envolvidos e as técnicas de amostragem analítica disponíveis [21].

1.5. REFERÊNCIAS

1. Plant, J. A.; Voulvoulis, N.; Ragnarsdottir, K. V.; Pollutants, Human Health and the Environment: A Risk Based Approach. John Wiley & Sons, 2012.
2. Ahmad, I.; Dar, M. A.; Perspectives in Water Pollution. InTech, 2013.
3. Rashed, M. N.; Organic Pollutants - Monitoring, Risk and Treatment. InTech, 2013.
4. Reeve, R; Introduction to Environmental Analysis. John Wiley & Sons, 2002.
5. Luo, Y; Guo, W.; Ngo, H. H.; Long, D. N.; Faisal, I. H.; Zhang, J.; Liang, S.; Wang, X. C.; A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. Science of the total environment, 473-474 (2014) 619-641.
6. Andreu, V.; Picó, Y.; Determination of currently used pesticides in biota. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 404 (2012) 2659-2681.
7. Wasi, S.; Tabrez, S.; Ahmad, M.; Toxicological effects of major environmental pollutants: an overview. Environmental Monitoring Assessability, 185 (2013) 2585-2593.

8. Faniband, M; Lindh, C. H.; Jönsson, B.A. G.; Human Biological monitoring of suspected endocrine-disrupting compounds. *Asian Journal of Andrology*, 16 (2014) 5-16.
9. Almeida, C.; Serôdio, P.; Florêncio, M. H.; Nogueira, J. M. F.; New strategies to screen for endocrine-disrupting chemicals in the Portuguese marine environment utilizing large volume injection–capillary gas chromatography–mass spectrometry combined with retention time locking libraries (LVI–GC–MS–RTL). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007) 2569-2583.
10. Mostafalou, S.; Abdollahi, M.; Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology* 268 (2013) 157-177.
11. Freire, C.; Koifman, S.; Pesticides, depression and suicide: A systematic review of the epidemiological evidence. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 216 (2013) 445-460.
12. Zenker, A.; Cicero, M. R.; Prestinaci, F; Bottoni, P; Carere, M.; Bioaccumulation and biomagnification of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management* 133 (2014) 378-387.
13. Jjemba, P. K.; PHARMA-ECOLOGY - The Occurrence and Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. John Wiley & Sons, 2008.
14. Deblonde, T.; Hartemann, P.; Environmental impact of medical prescriptions: assessing the risks and hazards of persistence, bioaccumulation and toxicity of pharmaceuticals. *Public Health* 127 (2013) 312-317.
15. Li, W. C.; Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution* 187 (2014) 193-201.
16. Jin, B.; Xie, L.; Guo, Y.; Pang, G.; Multi-residue detection of pesticides in juice and fruit wine: A review of extraction and detection methods. *Food Research International* 46 (2012) 399-409.
17. Buchberger, W. W.; Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 603–618.
18. Richardson, S. D.; Ternes, T. A.; Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, 83 (2011) 4614-4648.
19. Richardson, S. D.; Environmental Mass Spectrometry: Emerging contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 747-778.
20. Dean, J. R.; Methods for Environmental Trace Analysis. John Wiley & Sons, 2003.

21. Nogueira, J. M. F.; Novel Sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 757 (2012) 1-10.
22. Tankiewicz, M.; Fenik, J.; Biziuk, M.; Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. *Talanta*, 86 (2011) 8-22.
23. Koel, M.; Kaljurand, M.; Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. *Pure Applied Chemistry*, 78-11 (2006) 1993-2002.
24. Pawliszyn, J.; Lord, H. L.; Handbook of Sample Preparation. John Wiley & Sons, 2010.
25. Dean, J. R.; Extraction Techniques in Analytical Sciences. John Wiley & Sons, 2009.
26. Mitra, S.; Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, 2003.
27. Baltussen, E.; Cramers, C. A.; Sandra, P. J. F.; Sorptive sample preparation - a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373 (2002) 3-22.

CAPÍTULO 2

TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO SORTIVA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As técnicas de microextração sortiva têm despertado enorme interesse, devido à elevada capacidade sortiva dos materiais envolvidos no enriquecimento de analitos desde voláteis a involáteis. Entre estas técnicas, destacam-se a SPE, SPME e SBSE. As técnicas sortivas podem ser aplicadas na análise de amostras gasosas, líquidas ou sólidas, que ao usarem sorventes com as características indicadas para microextração, retêm eficazmente os analitos com interesse [1, 2].

De acordo com as características de cada sorvente, no fenómeno de sorção podem ocorrer dois fenómenos de retenção, nomeadamente a absorção e a adsorção. No processo de absorção ocorre partição dos analitos entre a fase sorvente (líquido), onde ficam retidos, e a matriz da amostra. A adsorção resulta de interações químicas entre os analitos e a superfície da fase sorvente (sólido), onde ficam retidos, e a matriz da amostra. Sendo que cada sorvente apresenta características físico-químicas distintas, os mecanismos de retenção envolvidos, quer ocorram no estado líquido ou sólido, são normalmente processos complexos. Por outro lado, estes mecanismos na maioria das vezes são de difícil demonstração experimental, ocorrendo por vezes em simultâneo durante o processo de microextração. Por essa razão, nestes casos o termo sorção é muitas vezes usado para referir os processos de interação entre os analitos e os sorventes usados [2-4].

2.2. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Introduzida há mais de três décadas, a SPE é uma das técnicas de amostragem mais usadas na atualidade, tendo como princípio básico o mecanismo de sorção, sendo que a dessorção é efetuada por intermédio de solventes orgânicos. A figura 2.1 ilustra um cartucho de SPE típico.



Figura 2.1 - Imagem exemplificativa de um cartucho de SPE.

Sendo um processo que ocorre no modo dinâmico, a amostra (tipicamente volumes até 0,5 L) é forçada a atravessar uma fase extrativa, onde os analitos com interesse ficam retidos, por intermédio de uma bomba de pressão ou sob vácuo. O solvente a usar para a eluição deve ser escolhido de acordo com a polaridade dos analitos envolvidos, sendo que o volume de solvente usado é normalmente de alguns mililitros. A SPE exige diversos passos, nomeadamente o condicionamento, carga (amostra), lavagem e a eluição, seguindo-se um passo de concentração por evaporação de solvente. No modo tradicional da SPE, a fase sorvente está contida num cartucho delimitada no início e no fim por um material poroso, que funciona como filtro e serve de suporte à fase sorvente (figura 2.1). A SPE, é dos processos mais versáteis, rápidos e eficientes das técnicas tradicionais de preparação de amostras, comparativamente à LLE, usando muito menor quantidade de solventes orgânicos. Nas últimas décadas, a LLE foi quase na totalidade substituída pela SPE, uma vez que demonstrou ser uma técnica poderosa na preparação de amostras e adequada para associação com análise cromatográfica. O modo de retenção dos analitos na fase sorvente da SPE é semelhante ao processo de retenção em HPLC. A escolha da fase sorvente deve basear-se na polaridade dos analitos com interesse a analisar. As fases sorventes disponíveis na SPE são de diverso tipo, com propriedades variadas e distintas. Os sorventes com características mais polares vão reter os analitos polares, enquanto os sorventes mais apolares vão reter os analitos apolares. Deste modo, é possível a seleção do cartucho de SPE com a fase

adequada, para ser aplicado a cada caso em particular. As fases sorventes mais usadas em SPE, têm como base a sílica modificada substituída com octil (C_8) ou octadecil (C_{18}) de características hidrofóbicas. Atualmente, com o objetivo de aumentar a eficiência da SPE para os analitos mais polares, o principal interesse reside no desenvolvimento de sorventes com características mais polares (ex. DVB, AC, Sílica, alumina, florisil, etc). Deste modo, é possível a aplicação da SPE a uma gama abrangente de analitos e em diversas áreas com interesse, nomeadamente em investigação científica e em laboratórios de análise. No entanto, presentemente o desenvolvimento das técnicas de preparação de amostras, direciona-se para a redução do número de passos analíticos, por forma a minimizar o tempo envolvido. Do mesmo modo, a redução do volume de amostra e de solventes orgânicos são fatores decisivos a ter sempre em consideração. Por outro lado, deve evoluir-se para a miniaturização dos dispositivos analíticos de microextração, por forma a melhorar a facilidade de manuseamento e redução de custos envolvidos. Nas últimas duas décadas, foram propostas outras técnicas de microextração sortiva que se revelaram alternativas muito promissoras, nomeadamente a SPME e a SBSE [3, 5-7].

2.3. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A SPME foi concebida pela necessidade de haver uma técnica de enriquecimento de execução rápida, sensível, requerendo baixo volume de amostra e isenta de solventes orgânicos. No início de 1990, J. Pawliszyn e colaboradores desenvolveram a SPME como nova técnica de microextração sortiva, com eliminação de solventes orgânicos ou *solventless*, simples, de rápida execução e com elevada sensibilidade e seletividade [2-6, 8].

Na SPME, o material sortivo é constituído por uma fibra que se encontra dentro de um dispositivo com o formato de seringa, possuindo um êmbolo que expõe a fase para a microextração ser processada conforme é apresentado na figura 2.2. A sorção dos analitos pode ser efetuada em dois modos. No modo de sorção por HS, a fibra de SPME é exposta para a microextração dos analitos voláteis e semi-voláteis que advêm da amostra. No modo de sorção imersa, a

fibra é mergulhada na matriz aquosa, para a microextração de compostos desde semi-voláteis a involáteis. Posteriormente, a fibra é recolhida para o interior da seringa e introduzida no injetor de um sistema cromatográfico. Para a retroextração podemos recorrer a dessorção térmica (TD), se a fibra for exposta num injetor quente de um sistema de GC, ou líquida (LD) se for exposta num injetor de *loop* de um sistema de HPLC com posterior análise cromatográfica.

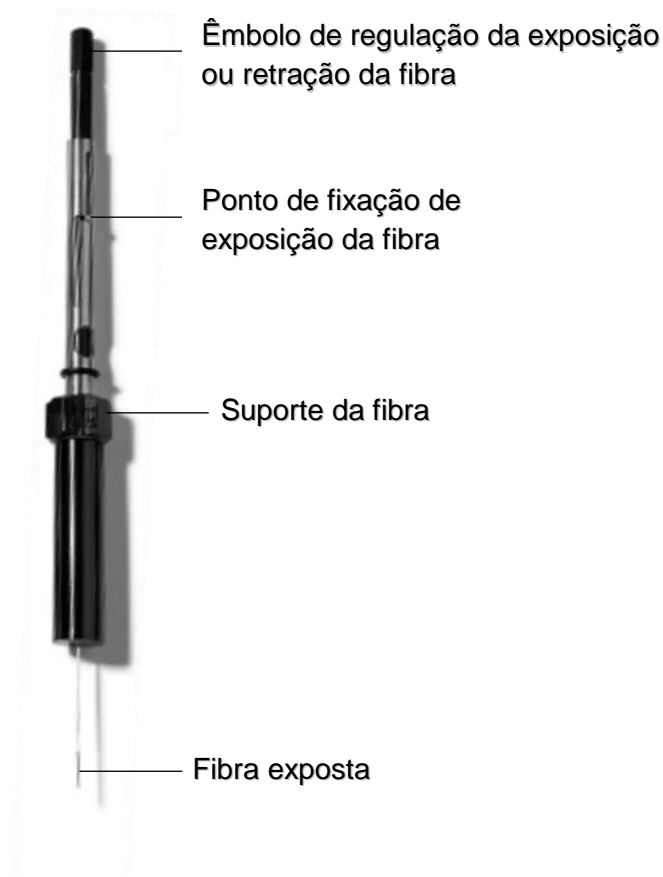


Figura 2.2 - Imagem exemplificativa de um dispositivo de SPME.

A SPME é tipicamente uma técnica sortiva que opera no modo estático, no qual a distribuição dos analitos é baseada num processo de equilíbrio entre a amostra e o material constituinte da fibra. Após atingido o equilíbrio e quando o volume de amostra é substancialmente superior ao volume do material sorvente, a quantidade em massa dos analitos extraídos pode ser calculada com recurso à expressão 1 simplificada:

$$n = K_{fs} \times V_f \times C_0 \quad (1)$$

na qual, n é a massa dos analitos extraídos, K_{fs} o coeficiente de partição do analito entre o sorvente da fibra e a amostra, V_f o volume do sorvente e C_0 a concentração inicial do analito na amostra. Neste dispositivo de microextração, um aspeto a ter em atenção, sendo crítico em qualquer aplicação da SPME, é a seleção da fase sorvente e portanto da fibra mais adequada para cada aplicação. São diversas as fases sorventes usadas em SPME, estando disponíveis fibras com PDMS (7, 30 e 100 μm de espessura), poliacrilato (PA, 85 μm), *carbowax* (CAR, 60 μm) e misturas de sorventes constituídas por CAR/PDMS (75/85 μm), DVB/PDMS (65 μm) e DVB/CAR (50/30 μm), abrangendo uma vasta gama de polaridades, desde o PDMS com características apolares até à de PA com características polares. As fibras de SPME podem ser reutilizadas, sendo que o tempo de vida depende do tipo de amostra e condições experimentais às quais são sujeitas. As vantagens inerentes a esta técnica, caracterizam-se principalmente pela ausência de solventes orgânicos, com simultânea extração, concentração e introdução instrumental dos analitos com interesse, mas também com possibilidade de automatização a sistemas cromatográficos. Por outro lado, é uma técnica que não requer grande investimento para operação, apenas utilizando cromatógrafos convencionais normalmente usados em laboratórios analíticos de rotina. As principais desvantagens estão associadas à fragilidade do material e ao tempo de vida, fundamentalmente nas análises de matrizes complexas e sujas. Outra desvantagem, é o facto de apresentar baixa capacidade, uma vez usar pequena quantidade de fase sorvente, que no caso da fibra com PDMS (100 μm) corresponde a um volume total de 0,5 μL . O pequeno volume de fase sorvente neste dispositivo limita a sensibilidade da técnica de SPME, geralmente indicada para responder ao nível dos ppb's ($\mu\text{g/L}$). Por este motivo, surgiu o desenvolvimento de outras técnicas alternativas de microextração sortiva, como é o caso da extração sortiva em barra de agitação (SBSE) [2-6, 8, 9].

2.4. EXTRAÇÃO SORTIVA EM BARRA DE AGITAÇÃO (SBSE)

A SBSE é uma técnica de microextração analítica desenvolvida por P. Sandra e colaboradores em 1999 [10], fundamentalmente vocacionada para a extração ultra-vestigial (ppt's) de compostos orgânicos em amostras aquosas. Esta técnica consiste no uso de um dispositivo constituído por um magnete envolto num tubo de vidro inerte, o qual é revestido por uma camada fina de PDMS, como é reproduzido na figura 2.3.



Figura 2.3 - Imagem exemplificativa de um dispositivo de SBSE.

O PDMS é uma fase polimérica que se caracteriza por possuir propriedades apolares, promovendo interações hidrofóbicas com os analitos alvo, no qual o mecanismo de retenção predominante ocorre principalmente através de forças de *van-der-Waals*, embora ligações de hidrogénio também possam ter lugar. Este polímero apresenta igualmente, boas propriedades de difusão e termoestabilidade, o que permite operar numa gama alargada e elevada de temperaturas e com isenção de solventes orgânicos (*solventless*), tendo por isso, sido proposta inicialmente para ser associada com retroextração por TD seguida de análise por GC [1, 10]. Do ponto de vista do desenvolvimento laboratorial, a barra é introduzida na amostra aquosa e, com recurso a agitação magnética, ocorre o processo de partição dos analitos entre a amostra e a fase sorvente, em condições experimentais otimizadas. Após o passo de extração, a barra é removida procedendo-se à retroextração, podendo ser por TD, com recurso a temperaturas elevadas através de uma unidade de dessorção térmica (TDU), exclusiva para análise por GC, ou em alternativa, por LD com recurso a solventes orgânicos adequados, podendo a análise ser efetuada por GC, HPLC e/ou CE [1, 10].

A base teórica da técnica de SBSE é em tudo semelhante à técnica de SPME. Considerando em aproximação, que o coeficiente de partição entre a fase orgânica e a fase aquosa ($K_{\text{PDMS/W}}$) de um analito é proporcional ao correspondente coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}), chega-se à expressão 2:

$$K_{\text{OW}} \approx K_{\text{PDMS/W}} = \frac{C_{\text{SBSE}}}{C_{\text{W}}} = \frac{m_{\text{SBSE}}}{m_{\text{W}}} \times \frac{V_{\text{W}}}{V_{\text{SBSE}}} \quad (2)$$

onde C_{SBSE} é a concentração de analito na fase de PDMS, C_{W} é a concentração de analito na fase aquosa, m_{SBSE} é a massa de analito na fase de PDMS, m_{W} é a massa de analito na fase aquosa, V_{SBSE} é o volume em PDMS utilizado e V_{W} é o volume de amostra aquosa utilizada. Tendo em conta a razão de fases $\beta = (V_{\text{W}} / V_{\text{SBSE}})$, a equação 2 pode ser reescrita para a expressão 3:

$$\frac{K_{\text{OW}}}{\beta} = \frac{m_{\text{SBSE}}}{m_{\text{W}}} = \frac{m_{\text{SBSE}}}{m_0 - m_{\text{SBSE}}} \quad (3)$$

sendo m_0 a quantidade inicial de analito presente na amostra aquosa, que possibilita estimar a eficiência de extração de um determinado analito a partir de uma amostra aquosa. Deste modo, a expressão 4 traduz a equação relativa à respetiva recuperação teórica percentual:

$$\text{Eficiência (\%)} = \left(\frac{m_{\text{SBSE}}}{m_0} \right) \times 100\% = \left(\frac{\frac{K_{\text{OW}}}{\beta}}{1 + \frac{K_{\text{OW}}}{\beta}} \right) \times 100\% \quad (4)$$

Através da expressão 4 é possível prever a eficiência da extração para um determinado analito e traçar a respetiva curva de recuperação teórica. Pela mesma relação, verifica-se que a recuperação depende essencialmente de dois

parâmetros ou da razão dos mesmos, nomeadamente, o K_{OW} e β . Neste sentido, a eficiência da extração depende da quantidade de sorvente envolvido no processo e do $\log K_{OW}$ dos analitos em estudo, sendo que ao usar quantidades de PDMS superiores, β diminui e consequentemente melhor será a eficiência do processo de microextração. Deste modo, a grande vantagem da SBSE comparativamente à SPME, é o volume de PDMS envolvido, o que se reflete posteriormente na melhor capacidade extrativa da SBSE, permitindo obter limiares analíticos mais baixos, sendo por isso mesmo mais conveniente para análise vestigial. A figura 2.4 reflete esta diferença de eficiência entre a SBSE e SPME, que é notória aquando da presença de maior quantidade de fase sorvente [1, 7, 11].

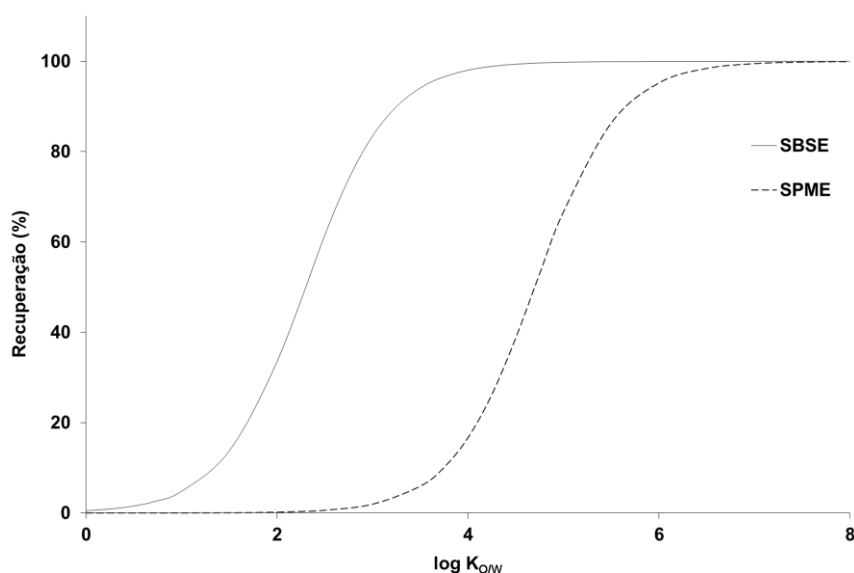


Figura 2.4 - Comparação da recuperação de SBSE (PDMS, 126 μ L) e SPME (PDMS, 0,5 μ L) em função do $\log K_{OW}$, em condições experimentais idênticas.

Duma forma geral, para compostos apolares, isto é, que se caracterizam por apresentarem um grau de hidrofobicidade elevado ($\log K_{OW} \geq 3$), a extração por SBSE(PDMS) é alcançada com elevada eficiência. Comercialmente é possível obter barras revestidas com PDMS contendo volumes compreendidos entre 24 e 126 μ L, podendo ser seleccionadas de acordo com o teor expectável nas amostras e respetiva polaridade dos analitos envolvidos [11, 12]. A figura 2.5, ilustra os modos possíveis de operação quer na extração quer na retroextração por SBSE.

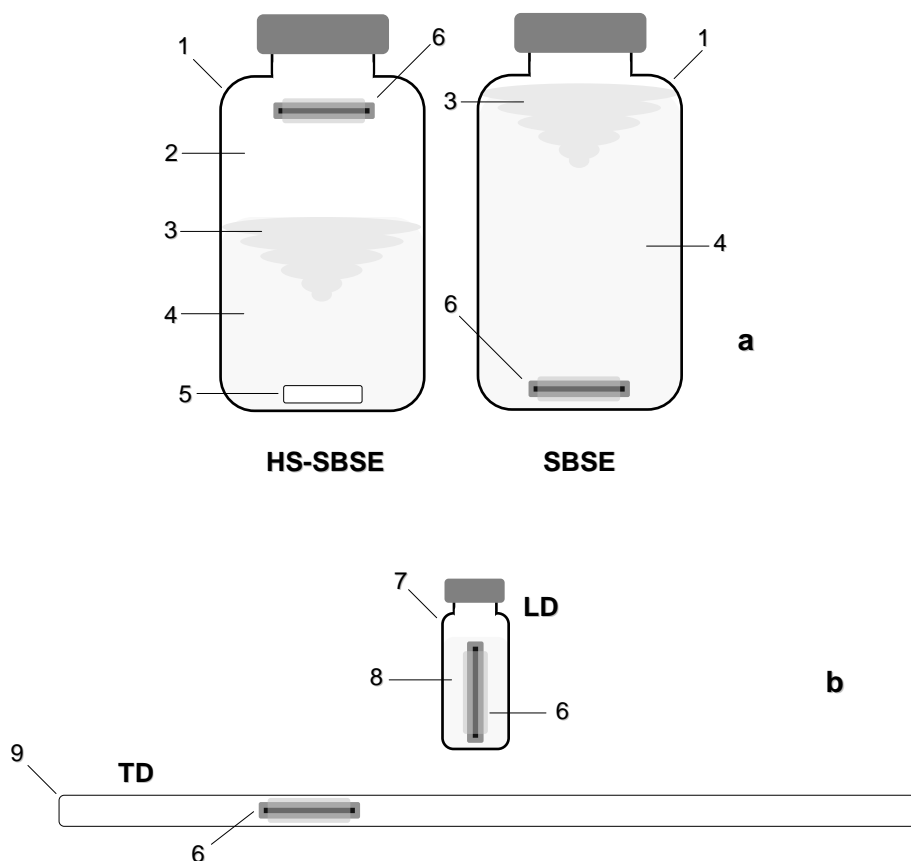


Figura 2.5 - Esquema ilustrando os modos de operação relativos à extração (a) e retroextração (b) usados pela técnica de SBSE. Legenda: 1 - Frasco de amostragem; 2 - HS; 3 - *Vortex*; 4 - Amostra; 5 - Barra de agitação magnética em Teflon; 6 - Dispositivo de SBSE; 7 - Vial; 8 - Solvente para LD; 9 - Tubo de vidro para TD [1].

A grande limitação da SBSE, centra-se no facto da resposta ser reduzida em termos de eficiência para analitos com $\log K_{OW} < 3$, isto é, com características polares, devido às inexistentes ou fracas interações hidrofóbicas geradas com os mesmos. Da necessidade de ultrapassar esta desvantagem, foram desenvolvidas novas estratégias analíticas, entre as quais se destacam os ensaios multimodo, processos de derivatização, novas fases poliméricas, ou ainda, novos dispositivos que usam fases sorventes com elevada capacidade para sorção de compostos polares. Nos ensaios multimodo, são usadas simultaneamente duas ou mais barras de SBSE por amostra, ou analisadas diversas amostras contendo apenas uma, sendo este processo denominado de modo-dual. No modo sequencial, no qual se variam as condições experimentais da matriz da amostra (ex. pH) durante a amostragem, usam-se duas ou mais barras de agitação individualmente. Os métodos multimodo são usados quando

a amostra contém famílias de compostos com propriedades físico-químicas diferenciados. Os processos de derivatização são outra estratégia usada recorrentemente, para modificação química dos compostos mais polares, conferindo-lhes características mais hidrofóbicas. No entanto, este é um processo moroso, que pode introduzir interferências, sendo específico para determinados analitos não sendo por isso mesmo abrangente [1, 13-16]. Adicionalmente, foram já desenvolvidas diversos revestimentos mais seletivos para ultrapassar todas as dificuldades inerentes à microextração dos analitos mais polares. Entre as várias opções desenvolvidas, destacam-se a barra-dual ou barra constituída por dois sorventes distintos, revestimentos com materiais monolíticos fixados por via química ou física, impressão molecular em polímeros, tecnologia de síntese polimérica de precipitação por imersão e tecnologia de síntese sol-gel, muitas das quais à base de PDMS. No entanto, muitos destes materiais apresentam desvantagens, nomeadamente, tempo de execução elevado, preparação complexa e baixa estabilidade [1, 17-19]. Nos últimos anos, foram ainda desenvolvidas espumas de poliuretano (PU) para SBSE, propostas como alternativa ao PDMS, revelando-se promissoras e contando já com diversas aplicações [1, 20-23]. Recentemente, foram desenvolvidos outros revestimentos para SBSE, à base de etilenoglicol-silicone (EG-PDMS) e de PA, as quais já se encontram disponíveis comercialmente, embora com poucas aplicações propostas [17, 24, 25]. Devido à grande dificuldade para o enriquecimento de analitos polares em diversas matrizes reais, foram recentemente introduzidas as técnicas inovadoras de microextração adsortiva (A_μE). A figura 2.6, resume um diagrama onde se propõe diversas estratégias para análise por SBSE(PDMS) e técnicas relacionadas, de acordo com a polaridade dos compostos orgânicos e compatibilidade com os sistemas instrumentais.

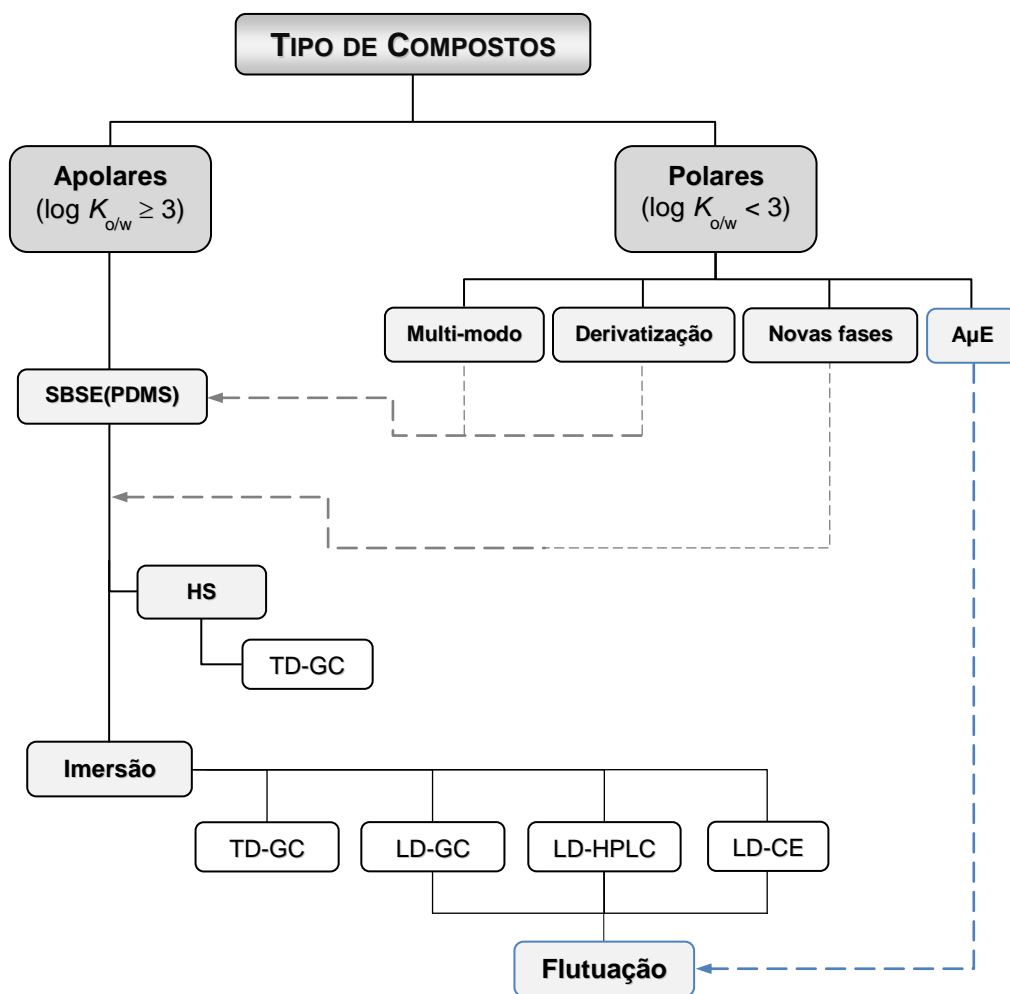


Figura 2.6 - Diagrama que ilustra as possíveis estratégias analíticas para análise por SBSE(PDMS) de acordo com a polaridade dos compostos orgânicos envolvidos e os sistemas instrumentais compatíveis [1].

2.5. MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA (AμE)

A microextração adsortiva (AμE) foi proposta, desenvolvida e concebida, fundamentalmente para solucionar as limitações da SBSE(PDMS) na análise de analitos orgânicos com características mais polares. Neste sentido, a AμE surge como forma de dar resposta, em particular, às dificuldades no enriquecimento dos analitos polares, tendo demonstrado enorme potencial, mostrando ser uma boa alternativa relativamente a outras técnicas de microextração estática. As técnicas de AμE, recorrem ao uso de dispositivos nos quais são fixados materiais sorventes com elevada capacidade sortiva, operando através da inovadora tecnologia de amostragem por flutuação, revelando ser efetiva como microextração estática, e abrangente na análise de resíduos para um alargado

grupo de compostos orgânicos, com características desde polares a apolares [1, 26].

2.5.1. Configurações geométricas dos dispositivos

Numa primeira fase, foram desenvolvidas duas configurações distintas na sua geometria e preparação, para ambas operar no modo de flutuação. Na microextração adsortiva em barra (BA μ E), o dispositivo apresenta geometria cilíndrica, sendo constituída por um suporte em polipropileno (PPP) com formato cilíndrico, ao qual são fixados sorventes apropriados com recurso a um adesivo apropriado para colagem. Na microextração adsortiva em multiesferas (MSA μ E), o dispositivo apresenta geometria com base em pequenas esferas, sendo constituído por um suporte em poliestireno expandido com formato esférico, ao qual são fixados sorventes apropriados com recurso a tratamento térmico. A figura 2.7 ilustra os dois tipos de configuração usados nos dispositivos descritos. No entanto, uma vez a BA μ E ter revelado melhor desempenho analítico do ponto de vista da preparação, manipulação experimental, estabilidade e desempenho em microextração, foi preferencialmente usada [1, 26].

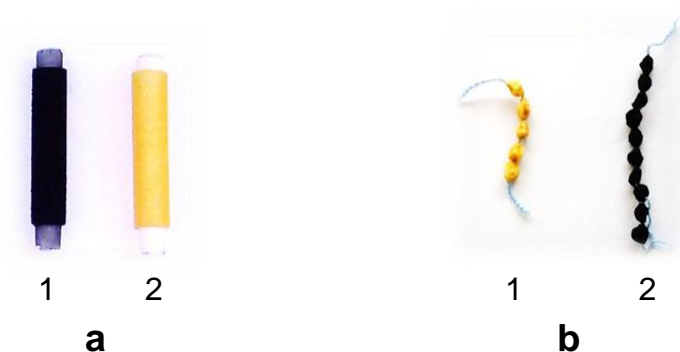


Figura 2.7 - Imagens ilustrativas da BA μ E (a) revestida com ACs (1) e PS-DVB (2), e da MSA μ E (b) revestida com PS-DVB (1) e ACs (2).

A geometria cilíndrica da barra (BA μ E), possui dimensões típicas contendo 15 mm em comprimento e 3 mm de diâmetro. Dado que este dispositivo apresenta uma massa muito reduzida quando revestida pelos sorventes, oscilando entre 1,0 e 5,0 mg, torna-se menos denso que a matriz

aquosa. Este facto é favorável e apresenta-se como grande vantagem, permitindo que o dispositivo flutue durante o processo de microextração com recurso a uma barra de agitação magnética convencional. Deste modo, são evitados quaisquer choques mecânicos derivados da agitação magnética, o que poderia levar à desagregação do material sorvente. Na tecnologia de amostragem por flutuação estática, o enriquecimento é promovido através da força centrípeta provocada pela agitação de uma barra de teflon convencional, que força os analitos a migrarem por difusão desde o seio da amostra até à fase sorvente. Em termos de estabilidade do dispositivo analítico, inúmeros testes foram efetuados de modo a avaliar a robustez do mesmo. A resistência a solventes orgânicos, ao pH da matriz, temperatura e resistência mecânica, evidenciaram elevada capacidade física e química no que respeita à fixação das fases sorventes envolvidas. Este dispositivo pode ainda ser reutilizado, embora essa possibilidade esteja dependente do nível de complexidade das matrizes em estudo, dos analitos envolvidos e dos sorventes utilizados [26].

2.5.2. Características das fases sorventes

Em qualquer processo de microextração, o material sorvente deve de ser cuidadosamente selecionado de acordo com os analitos em estudo, para que seja possível alcançar a máxima eficiência. Dum modo geral, os analitos em estudo são retidos no material sorvente, sendo para isso determinante conhecer as características dos mesmos para cada aplicação em particular. Genericamente, devido à elevada área superficial que os materiais sólidos apresentam, com tamanho de partículas inferiores a 30 μm e porosidade variada, os analitos polares são facilmente retidos em locais ativos, sendo condicionados pelas interações electrostáticas e/ou de dispersão que possam ocorrer [1, 27]. A figura 2.8 ilustra um esquema relativo à constituição dos materiais usados na BA μ E.

Os carvões ativados (ACs) são um caso específico de materiais sólidos, sendo caracterizados por apresentarem partículas nanoestruturadas. A estrutura porosa é composta por poros com dimensões diferenciadas, constituída por macroporos com tamanho superior a 50 nm, mesoporos com tamanho

compreendido entre 2 a 50 nm e microporos tipicamente com tamanhos inferiores a 2 nm [28].

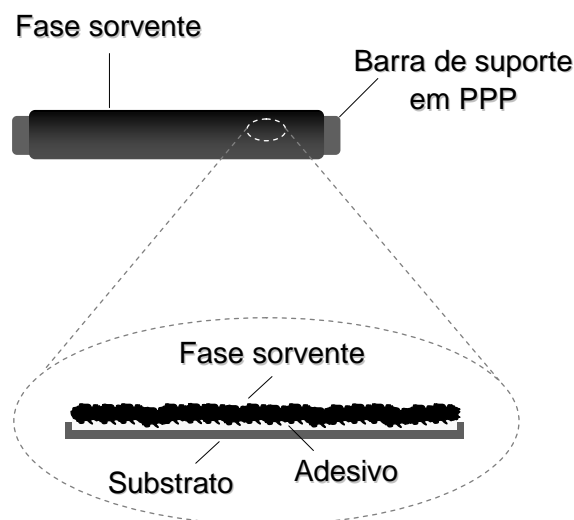


Figura 2.8 - Representação esquemática da constituição do dispositivo de BAμE [1].

Genericamente, os ACs caracterizam-se por apresentarem áreas superficiais específicas que podem ir até $1200 \text{ m}^2/\text{g}$, devido à presença das micro e mesoporosidades. Estas características texturais fazem com que os ACs sejam materiais sorventes de eleição para a microextração de diversos analitos, favorecendo a difusão dos mesmos na estrutura porosa, possibilitando a penetração através dos mesoporos e microporos. Para além disso, os ACs apresentam grande capacidade de retenção ($\approx 100 - 500 \text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$), possuindo centros ativos onde podem ocorrer interações electroestáticas e/ou dispersivas (propriedades de “adsorção-dessorção”), sendo considerados materiais excelentes para microextração de compostos orgânicos, uma vez encontrarem-se abaixo dos correspondentes patamares isotérmicos, não sendo por esse motivo aplicáveis as considerações teóricas de Langmuir e Freundlich [1, 26]. Além da composição da rede estrutural dos ACs serem essencialmente à base de carbono, a química da superfície é muito importante para as aplicações analíticas. Assim, potenciais grupos químicos e heteroátomos (oxigénio, hidrogénio e azoto) que compõem a superfície dos ACs, podem determinar os

mecanismos efetivos de interação, conferindo-lhes características ácidas ou básicas. Como consequência, o pH_{PZC} (pH do ponto de carga zero) dos ACs vai ser determinado de acordo com a composição química superficial, sendo muito importante nos tipos de mecanismos de interação na matriz envolvente, assim como nos analitos em estudo [1, 28, 29]. Outros tipos de materiais como os sorventes poliméricos, podem ser usados em alternativa aos ACs, de acordo com as vantagens que possam oferecer em cada aplicação específica. Duma forma geral, os sorventes poliméricos apresentam sistemas estruturados que resultam de sucessivas repetições de unidades básicas denominadas de monómeros, as quais estão ligadas por ligações covalentes fortes. As características dos polímeros derivam da natureza química e distribuição de massa em toda estrutura do polímero. Por outras palavras, a natureza das unidades básicas e dos grupos químicos presente nas extremidades, bem como a densidade da estrutura global, vão ser determinantes nos mecanismos de interação e morfologia dos polímeros [30, 31]. Um bom exemplo de polímeros recorrentemente usados são sorventes à base de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB). Muitos destes materiais poliméricos apresentam mecanismos múltiplos de interação, retendo os analitos através de interações π - π , dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio e iónicas. Igualmente importantes nas interações, são as características texturais dos materiais, nomeadamente o tamanho da partícula, a área superficial, a microporosidade e o pH. Duma forma geral, os ACs e polímeros são materiais que devem ser selecionados através de ensaios preliminares, tendo em conta as características de polaridade dos analitos e da matriz envolvida, por forma a ultrapassar as limitações evidenciadas por outras técnicas de microextração [1, 32, 33].

2.5.3. Método de desenvolvimento analítico da BA μ E

O desenvolvimento experimental e aplicação desta técnica é em tudo muito semelhante à SPME e SBSE, mostrando algumas diferenças para adaptação aos sistemas em estudo. Neste sentido, a execução experimental da BA μ E é composta por dois passos fundamentais, nomeadamente a microextração dos analitos da amostra, seguida da retroextração dos mesmos

da fase sorvente para um solvente adequado para posterior injeção no sistema instrumental. Numa primeira fase, o dispositivo é introduzido no seio da amostra em contacto com os analitos de interesse, onde por intermédio de agitação magnética, o enriquecimento se processa no modo de flutuação. Para o desenvolvimento de qualquer metodologia usando o dispositivo BAμE, a escolha do sorvente é essencial para obtenção da melhor eficiência e seletividade. Nesse sentido, são geralmente efetuados ensaios em água ultrapura fortificada contendo os analitos com interesse, em condições experimentais padrão. Após seleção da melhor fase sorvente, para obtenção da máxima eficiência no processo de amostragem por flutuação, as condições experimentais têm de ser otimizadas [30]. A figura 2.9 ilustra o modo de operação por flutuação durante a extração e respetiva retroextração por BAμE.

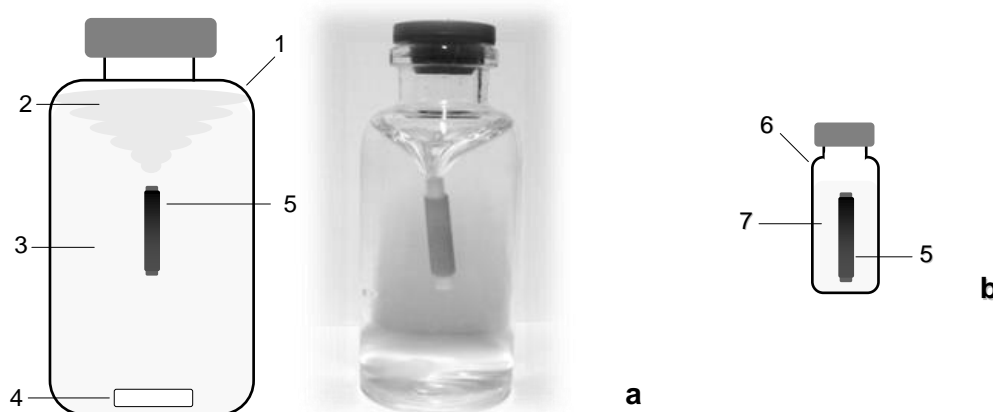


Figura 2.9 - Esquema e imagem exemplificando os modos de operação da microextração por flutuação (a) e retroextração por LD (b) usados na técnica BAμE. Legenda: 1 - Frasco de amostragem; 2 - Vortex; 3 - Amostra; 4 - Barra de agitação magnética em Teflon; 5 - Dispositivo de BAμE; 6 - Vial; 7 - Solvente para LD [1].

Numa primeira abordagem, são efetuados ensaios sistematizados univariantes no sentido de otimizar as variáveis mais importantes, nomeadamente, o tempo de equilíbrio e a velocidade de agitação. Estes dois parâmetros têm influência direta na cinética das interações entre os analitos e a fase sorvente, assim como na velocidade de difusão dos analitos do seio da

matriz para a fase sorvente. Embora a velocidade de agitação seja importante, já que condiciona a cinética de sorção, velocidades elevadas podem levar o dispositivo a ficar instável devido à turbulência gerada e embater nas paredes do frasco de amostragem, originando ligeira desagregação da fase sorvente. Seguidamente, a otimização de parâmetros termodinâmicos como o pH, polaridade e força iónica da matriz são igualmente essenciais. Deste modo, o controlo do pH é fundamental, principalmente para analitos com propriedades ácidas ou básicas, uma vez promover a dissociação dos mesmos e influenciar diretamente as interações que possam ocorrer com as fases sorventes. Por fim, a polaridade e a força iónica da matriz são variáveis essenciais a otimizar, usando-se genericamente álcoois (ex. metanol) e eletrólitos fortes (ex. cloreto de sódio), no sentido do controlo dos fenómenos do *salting-out* e *wall-effect*, respetivamente [1]. Após o estudo e estabelecimento das condições de extração ótimas, inicia-se a otimização do processo de retroextração no modo LD, adequada para analitos semi-voláteis e involáteis. A retroextração dos analitos é efetuada por LD, com recurso a solventes orgânicos adequados, sendo ensaiados diversos solventes ou misturas compatíveis com a técnica BAμE, assim como o tempo sob tratamento ultrassónico. Na LD, é condição essencial a imersão completa do dispositivo de microextração, para garantir que a retroextração seja completa. Por fim, a alíquota obtida pode ainda ser evaporada, ocorrer troca de solvente e analisada instrumentalmente, com recurso a GC, HPLC, CE ou técnicas hifenadas, dependendo de cada aplicação em particular.

2.5.4. Validação e aplicação da BAμE

Após o estabelecimento das condições experimentais otimizadas e necessárias para obtenção de máxima eficiência, procede-se à validação do método analítico, onde são avaliados os limiares analíticos, isto é, os limites de deteção (LODs) e de quantificação (LOQs), gama linear dinâmica, exatidão e precisão. Posteriormente realizam-se ensaios em amostras com interesse para cada aplicação em particular, sob condições experimentais otimizadas. Este passo é importante para a determinação dos analitos em estudo em matrizes

reais, mas também para demonstrar todas as vantagens analíticas do método em questão, como sendo uma boa alternativa a outras técnicas de microextração, nomeadamente quando estão envolvidas amostras com complexidade elevada. Todavia, a eficiência de qualquer técnica de microextração, tal como a BAμE, pode ser afetada pelos diversos interferentes presentes nas amostras reais. Neste sentido, e após a otimização e validação, o comportamento analítico da BAμE deve ser cuidadosamente avaliado. Por forma a minimizar os efeitos de matriz, uma estratégia comum é o recurso ao método de adição de padrão (SAM). Neste contexto, a BAμE tem sido usada com sucesso em diversas aplicações, como técnica de microextração para determinação residual de diversos compostos prioritários em diversas áreas, sendo uma boa alternativa a outras técnicas de microextração sortiva bem estabelecidas. Como exemplos das diversas aplicações da BAμE, incluem-se a determinação de herbicidas triazínicos, subprodutos da desinfecção (carbonilos de cadeia curta), fármacos (ibuprofeno, ácido clofibrico, acetaminofeno), cafeína, drogas de abuso (morfina, codeína, metabolitos da heroína) e polifenóis, em amostras de água para consumo humano, água superficial, águas residuais, águas estuarinas, fluídos biológicos (ex. urina) e bebidas (sumos), entre outras [1, 26, 34-40].

Em resumo, a BAμE tem demonstrado desempenho notável para diversas classes de analitos, em particular com características polares, sendo uma técnica com grande potencial analítico e complementar à SBSE. A BAμE, que opera no modo estático por flutuação, tem ainda a vantagem de se poder selecionar o material sorvente mais adequado para cada aplicação e apresentar manipulação experimental de elevada facilidade analítica. O dispositivo BAμE pode ainda ser reutilizado, apesar do custo associado a cada barra ser negligenciável.

A figura 2.10 ilustra o procedimento analítico genérico adotado na aplicação das técnicas de microextração sortiva, onde se inclui a BAμE.

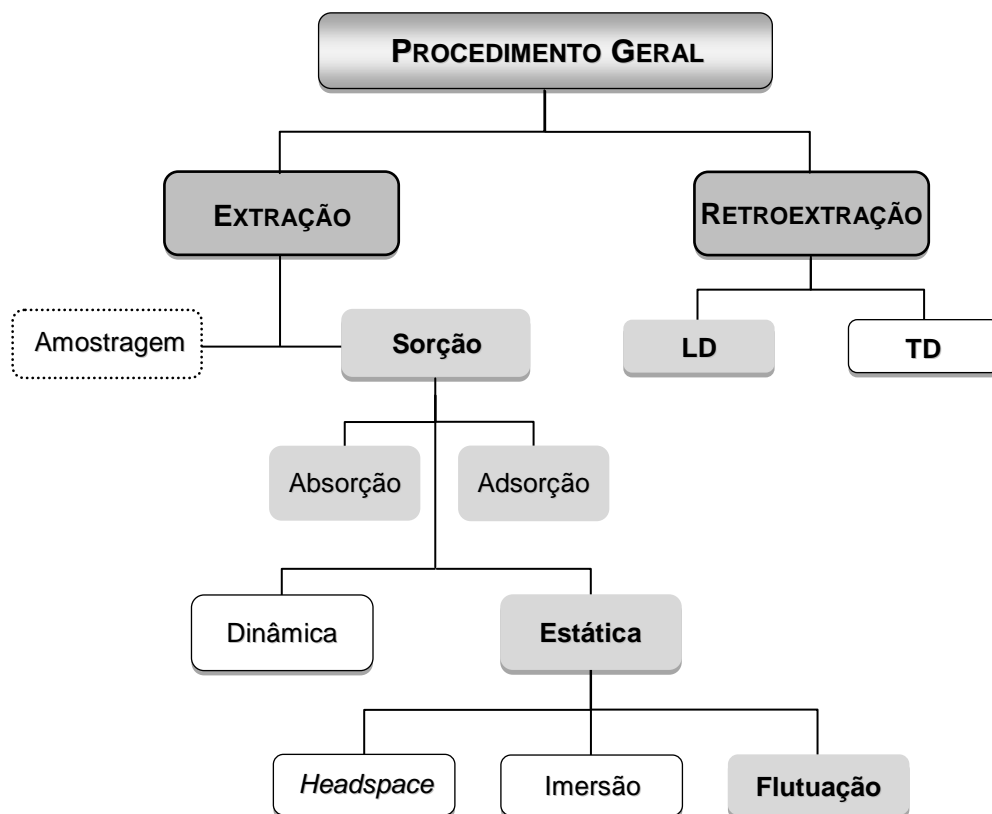


Figura 2.10 - Diagrama resumo que ilustra o procedimento analítico genérico usado nas técnicas de microextração sortiva. O fundo cinzento claro indica os modos de operação da BAμE.

2.6. REFERÊNCIAS

1. Nogueira, J. M. F.; Novel Sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 757 (2012) 1-10.
2. Ramos, L.; Ramos, J. J.; Brinkman, U. A. T.; Miniaturization in sample treatment for environmental analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381 (2005) 119-140.
3. Pawliszyn, J.; Lord, H. L.; *Handbook of Sample Preparation*. John Wiley & Sons, 2010.
4. Mitra, S.; *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, 2003.
5. Tankiewicz, M.; Fenik, J.; Biziuk, M.; Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. *Talanta*, 86 (2011) 8-22.
6. Dean, J. R.; *Extraction Techniques in Analytical Sciences*. John Wiley & Sons, 2009.

7. Almeida, C.; Rosário, P.; Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. *Química*, 95 (2004) 69-77.
8. Pawliszyn, J.; *Solid-Phase MicroExtraction: Theory and practice*. Wiley-VCH, 1997.
9. Pena-Pereira, F.; Duarte, R. M. B. O.; Duarte, A. C.; Considerations on the application of miniaturized sample preparation approaches for the analysis of organic compounds in environmental matrices. *Central European Journal of Chemistry*, 10(3) (2012) 433-449.
10. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.; Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) - a novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles", *Journal of Microcolumn Separations*, 11 (1999) 737-747.
11. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 517 (2004) 21-32.
12. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Development of a stir-bar-sorptive extraction-liquid desorption-largevolume injection capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2005) 1141-1151.
13. Prieto, A.; Basauri, O.; Rodil, R.; Usobiaga, A.; Fernández, L. A.; Etxebarria, N.; Zuloaga, O.; Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 22642-2666.
14. Sampedro, M. C.; Goicolea, M. A.; Unceta, N.; Sánchez-Ortega, A.; Barrio, R. J.; Sequential stir bar extraction, thermal desorption and retention time locked GC-MS for determination of pesticides in water. *Journal of Separation Science*, 32 (2009) 3449-3456.
15. Neng, N. R.; Cordeiro, C. A. A.; Freire, A. P.; Nogueira, J.M.F.; Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and biological matrices by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1169 (2007) 47-52.
16. Ferreira, A. M. C.; Moder, M.; Laespada, M. E. F.; Stir bar sorptive extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soil, sediment and sludge with in situ derivatization and determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 3837-3844.
17. Gilart, N.; Marcé, R. M.; Borrull, F.; Fontanals, N.; New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging contaminants. *Trends in analytical chemistry* 54 (2014) 11-23.
18. Rykowska, I.; Wasiak, W.; Advances in Stir Bar Sorptive Extraction Coating: A Review. *Acta Chromatographica*, 25(1) (2013) 27-46.

19. Bicchi, C; Cordero, C; Liberto, E.; Rubiolo, P; Sgorbini, B; David, F.; Sandra, P.; Dual-phase twistors: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction. *Journal of chromatography A*, 1094 (2005) 9-16.
20. Neng, N. R.; Pinto, M. L.; Pires, J.; Marcos, P. M.; Nogueira, J. M. F.; Development, optimisation and application of polyurethane foams as new polymeric phases for stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*, 1171 (2007) 8-14.
21. Portugal, F. C. M; Pinto, M. L.; Nogueira, J. M. F.; Optimization of Polyurethane Foams for Enhanced Stir Bar Sorptive Extraction of Triazinic Herbicides in Water Matrices. *Talanta*, 77 (2008) 765-773.
22. Portugal, F. C. M; Pinto, M. L.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Potentialities of polyurethane foams for trace level analysis of triazinic metabolites in water matrices by stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3707-3710.
23. Silva, A. R. M.; Portugal, F. C. M.; Nogueira, J. M. F.; Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices: Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases. *Journal of Chromatography A*, 1209 (2008) 10-16.
24. Cacho, J. I.; Campillo, N.; Viñas, P.; Córdoba, M. H.; Stir bar sorptive extraction with EG-silicone coating for bisphenols determination in personal care products by GC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 78-79 (2013) 255-260.
25. Cacho, J. I.; Campillo, N.; Viñas, P.; Córdoba, M. H.; Stir bar sorptive extraction polar coatings for the determination of chlorophenols and chloroanisoles in wines using gas chromatography and mass spectrometry. *Talanta* 118 (2014) 30-36.
26. Neng, N. R.; Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; Adsorptive micro-extraction techniques - Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7303-7310.
27. Ding, L.; Snoeyink, V. L.; Mariñas, B.J.; Yue, Z.; Effects of powdered activated carbon pore size distribution on the competitive adsorption of aqueous atrazine and natural organic matter. *Environmental Science and technology*, 42 (2008) 1227-1231.
28. Delhaes, P.; Carbon Science and Technology. John Wiley & Sons, 2012.
29. Mestre, A. S.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Parra, J. B.; Carvalho, A. P.; Ania, C. O.; Waste-derived activated carbons for removal of ibuprofen from solution: role of surface chemistry and pore structure. *Bioresource Technology*, 100 (2009) 1720-1726.
30. Van Krevelen, D. W.; te Nijenhuis, K.; Properties of polymers. Elsevier, 2009.
31. Gnanou, Y.; Fontanille, M.; Organic and physical chemistry of polymers. John Wiley & Sons, 2008.

32. Mestre, A. S.; Pinto, M. L.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Carvalho, A. P.; Effect of solution pH on the removal of clofibric acid by cork-based activated carbons. *Carbon*, 48 (2010) 972-980.
33. Mestre, A. S.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Carvalho, A. P.; Activated carbons for the adsorption of ibuprofen. *Carbon*, 45 (2007) 1979-1988.
34. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) with in situ derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 3155-3163.
35. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices. *Talanta* 83 (2011) 1643-1649.
36. Neng, N. R.; Mestre, A.S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibric acid in environmental and biological matrices. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6263-6270.
37. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (2012) 1355-1364.
38. Gonçalves, A. F. P.; Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Development of a Powdered Activated Carbon in Bar Adsorptive Micro-extraction for Heroin Metabolites Analysis. *Journal of Chromatographic Science*. 50 (2012) 574-581.
39. Neng, N. R.; Santalla, R. P.; Nogueira, J. M. F.; Determination of tributyltin in environmental water matrices using stir bar sorptive extraction with in-situ derivatisation and large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 126 (2014) 8-11.
40. Neng, N. R.; Sequeiros, R. C.; Nogueira, J. M. F.; Combining bar adsorptive microextraction with capillary electrophoresis-application for the determination of phenolic acids in food matrices. *Electrophoresis* 35(17) (2014) 2488-2494.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS DA TESE

3. OBJETIVOS DA TESE

Apesar da técnica BAμE ter, até ao momento, evidenciado notável resposta em análise vestigial com abrangência a diversas classes de compostos prioritários, denota alguns aspetos suscetíveis de serem aperfeiçoados e melhorados no que diz respeito ao desempenho analítico. Por outro lado, a aplicação desta técnica a outras classes de compostos emergentes é imperativa, fundamentalmente se demonstrar vantagens inequívocas comparativamente com técnicas de microextração baseadas em sorção.

Neste sentido, os principais objetivos da presente tese visam os seguintes aspetos:

- Desenvolvimento e aplicação da técnica BAμE na monitorização vestigial de diversas classes de compostos emergentes, como alternativa analítica bem estabelecida a outros métodos dedicados em rotina;
- Redução do dispositivo da BAμE como abordagem ainda mais efetiva para microextração sortiva em análise vestigial;
- Melhoramento do passo de retroextração da BAμE para uma combinação ainda mais fácil, prática e compatível com a instrumentação analítica.

Estas novas abordagens, permitem tornar esta técnica analítica ainda mais abrangente, direcionar-se no sentido da miniaturização analítica e criar condições para uma melhor combinação com a instrumentação analítica, minimizando a manipulação experimental.

Os novos conceitos a desenvolver, pretendem assim alcançar maior sensibilidade e seletividade analíticas, tornando a BAμE ainda mais promissora e atender aos princípios da química analítica verde.

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1. REAGENTES QUÍMICOS

4.1.1. Padrões analíticos

Todos os padrões analíticos usados ao longo do trabalho eram certificados.

4.1.1.1. Fungicidas

O ciprodinil (CYP; 99,8 %), procimidona (PROC; 99,9 %), benalaxil (BEN; 99,9 %), foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Alemanha). A azoxistrobina (AZO; 99,9 %), difenoconazol (DIF; 97 %), metalaxil-M (MET; 99 %), miclobutanil (MYC; 99,4 %), penconazol (PEN; 99,1 %), tebuconazol (TEB; 99,6 %), flusilazol (FLU; 99,8 %) foram fornecidos pela Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha).

4.1.1.2. Benzofenonas

A benzofenona (BPF; > 99,0 %) foi fornecida pela Fluka (Sigma-Aldrich, Alemanha). A 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona (HMB; 98 %), 2,4-hidroxibenzofenona (DHB; 99 %) e 4-hidroxi-benzofenona (HBP; > 99 %) foram fornecidas pela Acros Organics (EUA).

4.1.1.3. Inseticidas repelentes

A *N,N*-dietil-*meta*-toluamida (DEET; 98,0 %) e a permetrina (PERM, mistura de isômeros *cis* e *trans*; 94,4 %) foram fornecidas pela Acros Organics (EUA) e Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha), respectivamente.

4.1.1.4. Parabenos

O metilparabeno (MP; 99 %), etilparabeno (EP; 99 %), propilparabeno (PP; > 99 %) e butilparabeno (BP; > 99 %) foram fornecidos pela Acros Organics (EUA).

4.1.1.5. Fármacos

A furosemida (FUR; 99,0 %) foi fornecida pelo Dr. Ehrenstorfer (Alemanha) e o naproxeno (NAP; 98 %) pela Fluka (Buchs, Suíça). O cetoprofeno (KET; 98,0 %), a mebeverina *hydrochloride* (MEB), o diclofenaco de sódio (DIC) e o ácido mefenâmico (MEF) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Alemanha).

4.1.1.6. Hormonas

O estriol (EST; ≥ 97 %) foi fornecido pela Buchs (Suíça). O D-(-)-norgestrel (NOR; 99,0 %), progesterona (PRO; 98,0 %), estrona (ETR; 99,0 %), 17 β -estradiol (β -EST), 17 α -estradiol (α -EST) e mestranol (MES) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Alemanha). O 17 α -etinilestradiol (17 α -EE; 98,9 %) e 19-nortisterona (19-NOR; 98,5 %) foram fornecidos pela Riedel-de-Haën (Alemanha).

4.1.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentavam certificação analítica. Os solventes tinham qualidade para HPLC. O metanol (MeOH) e acetonitrilo (ACN) foram fornecidos pela Fisher Scientific (99,8 %; RU) e Carlo Erba (99,9 %; Arese, Itália). O acetato de etilo (AcEt; 99,5 %) e o hexano (*n*-C₆; 99 %) foram fornecidos pela Panreac (Espanha), e o pentano (*n*-C₅; 99,0 %) pela Riedel-de-Haën (Alemanha).

O cloreto de sódio (NaCl; 99,5 %) foi fornecido pela Merck (Alemanha) e Panreac (Espanha). O hidróxido de sódio (NaOH; 98,0 %) foi fornecido pela AnalaR (BDH chemicals, RU). O ácido clorídrico (HCl; 37 %) e o ácido *orto*-fosfórico (H₃PO₄; 85 %) foram fornecidos pela Panreac (Espanha).

A água ultrapura foi obtida através dum sistema de purificação Milli-Q (Millipore, EUA).

4.2. MATERIAL CORRENTE E EQUIPAMENTO DE LABORATÓRIO

Para desenvolvimento do presente trabalho, foi usado material de vidro corrente de laboratório, nomeadamente *gobelets* e provetas graduadas, assim como balões volumétricos. Foram igualmente usados, microseringas analíticas com êmbolo flexível de 10, 25, 50, 100 e 500 μL (Hamilton, EUA), frascos de vidro para amostragem de 25 mL (VWR Internacional, Portugal) com tampas de borracha (20 mm) e barras de agitação magnética (15 \times 4,5 mm; VWR Internacional, Portugal). Foram usados *vials* transparentes de 1,5 mL (VWR Internacional, Portugal), tampas (diâmetro = 11 mm), *inserts* (200 μL , 31 \times 6 mm; VWR Internacional, Portugal) e um encapsulador manual (Agilent Technologies, EUA).

Todos os ensaios foram efetuados numa placa de agitação magnética com quinze posições (Variomag, Alemanha). Para digestão de amostras, foi usada uma placa de agitação/aquecimento Heidolph MR-3001-K (Alemanha). As pesagens foram efetuadas numa balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça), e as medições de pH num medidor de pH Metrohm 744 pH Meter equipado com um eletrodo de vidro combinado (Suíça). Foi igualmente usado, um vortex (Velp, Itália), um banho de ultrassons equipado com termóstato (Branson 3510 E-DTH, EUA) e uma estufa Binder ED 115/E2 (Alemanha).

O presente trabalho foi desenvolvido com recurso a dois sistemas analíticos, um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrómetro de massa (GC-MS) e um cromatógrafo líquido de alta eficiência com deteção por rede de díodos (HPLC-DAD) ambos da Agilent Technologies (Alemanha). O sistema GC-MS era constituído por um GC (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683) e injetor de vaporização com temperatura programada (PTV), acoplado ao detetor seletivo de massa (Agilent 5973N). O registo de dados e o controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* MS ChemStation (G1701; versão C.00.00; Agilent Technologies, Alemanha). A coluna capilar utilizada foi a TRB-5MS (30 m de comprimento \times 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μm de espessura de fase estacionária; 95 % dimetil, 5 % difenil polisiloxano) da Teknokroma (Espanha). O sistema de HPLC-DAD era constituído por diversos módulos, nomeadamente um desgaseificador (G1322A),

bomba quaternária (G1311A), amostrador automático (G1313A), compartimento da coluna termostatizado (G1316A) e o detetor de rede de díodos (G1315B). O registo de dados e controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* LC3D ChemStation (versão Rev.A.10.02[1757], Agilent Technologies, Alemanha). As análises foram efetuadas em duas colunas: Mediterranea Sea-18 (150 × 2,1 mm, 5 µm; Teknokroma, Espanha) para as benzofenonas, parabenos e fármacos, e Kinetex hexil-fenil (150 × 4,6 mm, 2,6 µm; Phenomenex, EUA) para as hormonas.

4.3. FASES SORVENTES USADAS EM MICROEXTRAÇÃO

As barras de SBSE comercial (Twister; Gerstel, Müllheim a/d Ruhr, Alemanha) usadas possuíam 20 mm em comprimento e eram revestidas com um filme de 1,0 mm de espessura em PDMS (126 µL).

4.3.1. Ensaios com fungicidas

Os ACs usados tinham as seguintes características: AC1 (área superficial: 937 m²/g; pH_{PZC}: 6,5) e AC2 (área superficial: 896 m²/g; pH_{PZC}: 10,6), tendo sido fornecidos pela Riedel-de-Haën (Alemanha) e Salmon & Cia. (Portugal), respetivamente.

Entre os polímeros usados, o P1 (PS-DVB; tamanho de partícula: 40-120 µm, área superficial: 1200 m²/g) e P2 (PS-DVB; tamanho de partícula: 100 µm; tamanho de poro: 260 Å; área superficial: 500 m²/g; estabilidade de pH: 1-14) foram fornecidos pela Merck (Alemanha) e Phenomenex (EUA), respetivamente. O polímero P3 (pirrolidona modificada; tamanho de partícula: 33 µm; tamanho de poro: 85 Å; área superficial: 800 m²/g; estabilidade de pH: 1-14) foi fornecido pela Phenomenex (EUA). Os dispositivos para microextração (BAµE) possuíam em média uma massa em sorvente de 1,5 ± 0,2 mg em AC1, 1,5 ± 0,2 mg em AC2, 5,0 ± 0,3 mg em P1, 3,9 ± 0,3 mg em P2 e 2,5 ± 0,2 mg em P3.

4.3.2. Ensaaios com benzofenonas

Os ACs foram fornecidos pela Salmon & Cia (Portugal), nomeadamente o AC1 (área superficial: 1500 m²/g), AC2 (área superficial: 1100 m²/g), AC3 (área superficial: 900 m²/g), AC4 (área superficial: 1400 m²/g) e AC5 (área superficial: 1400 m²/g). Os dispositivos para microextração (BAμE) possuíam, em média, uma massa em sorvente de 3,2 ± 0,3 mg em AC1, 2,8 ± 0,1 mg em AC2, 1,9 ± 0,2 mg em AC3, 1,8 ± 0,1 mg em AC4 e 1,7 ± 0,3 mg em AC5.

Entre os polímeros usados, o P1 (PS-DVB; tamanho de partícula: 100 μm, tamanho do poro: 260 Å, área superficial: 500 m²/g), P2 (pirrolidona modificada; tamanho de partícula: 33 μm, tamanho do poro: 85 Å, área superficial: 800 m²/g) e P3 (ciano; tamanho de partícula: 55 μm, tamanho de poro: 70 Å, área superficial: 500 m²/g) foram fornecidos pela Tecnocroma (Portugal), apresentando todas estabilidade na gama de pH compreendida entre 1 e 14. Os dispositivos para microextração (BAμE) possuíam em média uma massa em sorvente de 3,9 ± 0,3 mg em P1, 2,5 ± 0,2 mg em P2 e 4,5 ± 0,3 mg em P3.

4.3.3. Ensaaios com inseticidas repelentes

Os ACs testados foram fornecidos pela Salmon & Cia (Lisboa, Portugal), nomeadamente o AC1 (área superficial: 1400 m²/g; pH_{PZC}: 6,4), AC2 (área superficial: 1400 m²/g; pH_{PZC}: 2,2), AC3 (área superficial: 1100 m²/g; pH_{PZC}: 7,5), AC4 (área superficial: 1500 m²/g; pH_{PZC}: 8,5) e AC5 (área superficial: 900 m²/g; pH_{PZC}: 8,4). Os dispositivos para microextração (BAμE) possuíam em média uma massa em sorvente de 1,8 ± 0,1 mg em AC1, 1,7 ± 0,3 mg em AC2, 2,8 ± 0,1 mg em AC3, 3,2 ± 0,3 mg em AC4 e 1,9 ± 0,2 mg em AC5.

Entre os polímeros usados, o P1 (pirrolidona modificada; tamanho de partícula: 33 μm; tamanho de poro: 85 Å; área superficial: 800 m²/g; estabilidade de pH: 1-14), P2 (PS-DVB; tamanho de partícula: 100 μm; tamanho de poro: 260 Å; área superficial: 500 m²/g; estabilidade de pH: 1-14) e P3 (ciano; tamanho de partícula: 55 μm; tamanho de poro: 70 Å; área superficial: 500 m²/g) foram fornecidos pela Tecnocroma (Portugal). Os polímeros iónicos testados, nomeadamente o P4 (troca aniónica-fase reversa; tamanho de partícula: 30 μm;

tamanho de poro: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade de pH: 0-14) e P5 (troca catiónica-fase reversa; tamanho de partícula: 60 µm; tamanho de poro: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade de pH: 0-14) foram fornecidos pela Via Athena (Portugal). Os dispositivos para microextração (BAµE) possuíam em média uma massa em sorvente de 2,5 ± 0,2 mg em P1, 3,9 ± 0,3 mg em P2, 4,5 ± 0,3 mg em P3, 1,6 ± 0,1 mg em P4 e 2,0 ± 0,2 mg em P5. As barras SBSE(PDMS; 126 µL) comerciais foram designadas por P6. As barras (BAµE) com metade do comprimento continham, em média, 0,9 ± 0,1 mg em AC2.

4.3.4. Ensaios com parabenos

Os ACs comerciais usados neste estudo, foram o AC1 (pH_{PZC}: 6,4; área superficial: 1400 m²/g), AC2 (pH_{PZC}: 2,2; área superficial: 1400 m²/g), AC3 (pH_{PZC}: 8,4; área superficial: 900 m²/g), AC4 (pH_{PZC}: 7,5; área superficial: 1100 m²/g) e AC5 (pH_{PZC}: 8,5; área superficial: 1500 m²/g) fornecidos pela Salmon & Cia (Portugal). Os dispositivos para microextração (BAµE) possuíam em média uma massa em sorvente de 1,8 ± 0,1 mg em AC1, 1,7 ± 0,3 mg em AC2, 1,9 ± 0,2 mg em AC3, 2,8 ± 0,1 mg em AC4 e 3,2 ± 0,3 mg em AC5.

Entre os polímeros usados, o P1 (PS-DVB; tamanho de partícula: 40-120 µm; área superficial: 1200 m²/g; estabilidade de pH: 1-13) fornecido pela Merck (LiChrolut® EN, Alemanha), o P2 (PS-DVB; tamanho de partícula: 100 µm; tamanho de poro: 260 Å; área superficial: 500 m²/g; estabilidade de pH: 1-14), o P3 (pirrolidona modificada; tamanho de partícula: 33 µm; tamanho de poro: 85 Å; área superficial: 800 m²/g; estabilidade de pH: 1-14) e o P6 (ciano; tamanho de partícula: 55 µm; tamanho de poro: 70 Å; área superficial: 500 m²/g; estabilidade de pH: 1-14) fornecidos pela Tecnocroma (Portugal). Quanto aos polímeros iónicos testados, o P4 (troca catiónica-fase reversa; tamanho de partícula: 30-60 µm; tamanho de poro: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade ao pH: 0-14) e o P5 (troca aniónica-fase reversa; tamanho de partícula: 30-60 µm; tamanho de poro: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade ao pH: 0-14) foram fornecidos pela Via Athena (Portugal). Os dispositivos para microextração (BAµE) possuíam em média uma massa em sorvente de 5,0 ± 0,3 mg em P1, 3,9 ± 0,3 mg em P2, 2,5 ± 0,2 mg em P3, 2,0 ± 0,2 mg em P4, 1,6 ± 0,1 mg em P5 e

4,5 \pm 0,3 mg em P6. O polímero P7 corresponde à SBSE(PDMS, 126 μ L). As barras (BA μ E) com metade do comprimento continham, em média, 0,9 \pm 0,1 mg em AC2.

4.3.5. Ensaaios com fármacos

Neste estudo, os ACs usados foram o AC1 (pH_{PZC}: 6,4; área superficial: 1400 m²/g), AC2 (pH_{PZC}: 2,2; área superficial: 1400 m²/g), AC3 (pH_{PZC}: 8,4; área superficial: 900 m²/g), AC4 (pH_{PZC}: 7,5; área superficial: 1100 m²/g) e AC5 (pH_{PZC}: 8,5; área superficial: 1500 m²/g) fornecidos pela Salmon & Cia (Portugal). Os dispositivos para microextração (BA μ E) possuíam em média uma massa em sorvente de 0,9 \pm 0,1 mg em AC1 e AC2, 1,0 \pm 0,1 mg em AC3, 1,4 \pm 0,1 mg em AC4 e 1,6 \pm 0,2 mg em AC5.

As fases poliméricas usadas eram constituídas pela P1 (PS-DVB; tamanho de partícula: 40-120 μ m; área superficial: 1200 m²/g; estabilidade ao pH: 1-13) fornecida pela Merck (LiChrolut[®] EN, Alemanha), P2 (pirrolidona modificada; tamanho de partícula: 33 μ m; tamanho de poro: 85 Å; área superficial: 800 m²/g; estabilidade ao pH: 1-14) fornecida pela Tecnocroma (Portugal), P3 (troca catiónica-fase reversa; tamanho de partícula: 30-60 μ m; tamanho de poro: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade ao pH: 0-14), P4 (troca aniónica-fase-reversa; tamanho de partícula: 30-60 μ m; tamanho de poro: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade ao pH: 0-14) e P5 (PS-DVB; tamanho de partícula: 30-60 μ m; tamanho de poro: 80 Å; área superficial: 810 m²/g; estabilidade ao pH: 0-14) fornecida pela Via Athena (Portugal). Os dispositivos para microextração (BA μ E) possuíam em média uma massa em sorvente de 2,5 \pm 0,2 mg em P1, 1,3 \pm 0,1 mg em P2, 1,0 \pm 0,1 mg em P3, 0,8 \pm 0,1 mg em P4 e 0,9 \pm 0,1 mg em P5.

4.3.6. Ensaaios com hormonas

Os ACs usados neste estudo foram o AC1 (pH_{PZC}: 6,4; área superficial: 1400 m²/g), AC2 (pH_{PZC}: 2,2; área superficial: 1400 m²/g), o AC3 (pH_{PZC}: 8,4;

área superficial: 900 m²/g), o AC4 (pH_{PZC}: 7,5; área superficial: 1100 m²/g) e AC5 (pH_{PZC}: 8,5; área superficial: 1500 m²/g), fornecidos pela Salmon & Cia (Portugal). Os dispositivos para microextração (BAμE) possuíam em média uma massa em sorvente de 0,9 ± 0,1 mg em AC1 e AC2, 1,0 ± 0,1 mg em AC3, 1,4 ± 0,1 mg em AC4 e 1,6 ± 0,2 mg em AC5.

As fases poliméricas usadas foram P1 (PS-DVB; tamanho de partícula: 40-120 μm; área superficial: 1200 m²/g; estabilidade ao pH: 1-13) fornecida pela Merck (LiChrolut® EN, Alemanha), P2 (pirrolidona modificada; tamanho de partícula: 33 μm; tamanho de poro: 85 Å; área superficial: 800 m²/g; estabilidade ao pH: 1-14) fornecida pela Tecnocroma (Portugal), P3 (troca catiónica-fase reversa; tamanho de partícula: 30-60 μm; tamanho de poro: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade ao pH: 0-14), P4 (troca aniónica-fase reversa; tamanho de partícula: 30-60 μm; tamanho de poro: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade ao pH: 0-14) e P5 (DVB; tamanho de partícula: 30-60 μm; tamanho de poro: 80 Å; área superficial: 810 m²/g; estabilidade ao pH: 0-14) fornecida pela Via Athena (Portugal). Os dispositivos para microextração (BAμE) possuíam em média uma massa em sorvente de 2,5 ± 0,2 mg em P1, 1,3 ± 0,1 mg em P2, 1,0 ± 0,1 mg em P3, 0,8 ± 0,1 mg em P4 e 0,9 ± 0,1 mg em P5.

4.4. AMOSTRAS

No presente trabalho, as amostras estudadas foram variadas e selecionadas de acordo com objetivo de cada estudo em particular e recolhidas em território nacional. Todos os ensaios envolvendo amostras reais foram efetuados em triplicado, representando sempre um volume final de ensaio de 25 mL. Todas as amostras foram filtradas (filtros whatman no. 1, RU), à exceção das amostras de água potável. As amostras de água foram processadas após a colheita, ou então armazenadas a 4 °C até um máximo de 24 horas para estudo. No caso de serem processadas após 24 horas da colheita, as amostras eram congeladas a -20 °C. Para o caso das amostras de urina, foram todas processadas após a colheita da primeira urina da manhã dos dadores

voluntários. Todas as diluições necessárias foram efetuadas usando água ultrapura.

4.4.1. Ensaaios com fungicidas

A amostra de água potável foi recolhida da rede de abastecimento de Lisboa (2011). A amostra de água subterrânea foi recolhida num poço na área circundante a Lisboa (2011). As amostras de vinho tinto e branco foram adquiridas numa superfície comercial em Lisboa (2011). Foram preparados e usados 25 mL de cada amostra de água e vinho processada.

4.4.2. Ensaaios com benzofenonas

A amostra de água marinha foi recolhida na Costa da Caparica (2011) e a água residual (após tratamento final) foi recolhida na estação de tratamento de águas residuais - Beirolos (2011). Os produtos cosméticos (*aftershave* e creme protetor solar) foram adquiridos numa superfície comercial em Lisboa (2011). A amostra de urina foi recolhida dum voluntário de sexo masculino com 34 anos de idade (2011).

Relativamente às amostras de água, foram preparados e usados 25 mL de cada amostra. No caso do *aftershave*, foi preparada uma diluição total de 1:50.000 (v/v) em água ultrapura, e usados 25 mL da diluição final. Para o creme protetor solar, foi preparado por pesagem cerca de 10 mg de creme. Posteriormente, foram diluídos em 500 mL de água ultrapura, da qual foram retirados 4 mL e diluídos num total de 250 vezes, do qual foi retirado 25 mL para os ensaios. Da amostra de urina, mediu-se rigorosamente 2 mL e diluídos para perfazer 25 mL de volume total.

4.4.3. Ensaaios com inseticidas repelentes

As amostras de água foram recolhidas na área metropolitana de Lisboa (2012), nomeadamente a amostra de água potável recolhida da rede de

abastecimento, a água subterrânea recolhida num poço, a água estuarina recolhida no estuário do rio Tejo e a água de piscina recolhida numa piscina de uso público. A água de rio foi recolhida do rio Alviela (Santarém, 2012). Todas as amostras efetuadas neste estudo foram usadas medindo cerca de 25 mL, sem efetuar qualquer tipo de diluição.

4.4.4. Ensaios com parabenos

A amostra de água potável foi recolhida da rede de abastecimento de Lisboa (2012), a água subterrânea de um poço (2012), a água estuarina no estuário do rio Tejo (2012) e a água de piscina de uma piscina pública (2012). As águas residuais foram obtidas da estação de tratamento de águas residuais - Beirolos (2012). Os produtos cosméticos (leite corporal e creme de mãos) foram adquiridos numa superfície comercial em Lisboa. A amostra de urina foi recolhida dum dador voluntário um indivíduo do sexo masculino com 35 anos de idade (2012).

No que respeita às amostras de água usadas, foram usados diretamente 25 mL de cada amostra. A amostra de urina foi usada efetuando uma diluição de 5 mL de urina para um volume total de 25 mL. A amostra de leite corporal foi preparada pesando 5,0 mg e diluindo posteriormente em 1000 mL de água ultrapura com a adição de 0,25 % (v/v) MeOH para facilitar a dissolução do leite corporal. A amostra de creme de mãos foi preparada pesando 4,9 mg, e efetuando o mesmo procedimento do leite corporal. De todas as diluições realizadas foram usados 25 mL para os ensaios.

4.4.5. Ensaios com fármacos

A amostra de água superficial foi recolhida do rio Alviela (Santarém, 2013). As restantes amostras de água foram recolhidas na área metropolitana de Lisboa, nomeadamente a subterrânea recolhida num poço, a estuarina recolhida no estuário do rio Tejo, a marinha recolhida numa zona balnear e as residuais da estação de tratamento de águas residuais - Beirolos (2013). As amostras de

urina foram recolhidas dum dador voluntário do sexo masculino com cerca de 30 anos de idade (2013).

No que respeita às amostras de água usadas, foram usados diretamente 25 mL de cada amostra. As amostras de urina foram usadas efetuando uma diluição de 1 mL de urina para um volume total de 25 mL. De todas as diluições realizadas, foram usados 25 mL para os ensaios.

4.4.6. Ensaaios com hormonas

As amostras de água foram recolhidas na área metropolitana de Lisboa, nomeadamente a subterrânea, a estuarina recolhida no estuário do rio Tejo, a marinha recolhida numa zona balnear e as residuais da estação de tratamento de águas residuais - Beirolos (2013).

No que respeita às amostras de água usadas, foram usados diretamente 25 mL de cada amostra. As amostras de urina foram voluntariamente cedidas por dois indivíduos do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 20 e os 30 anos, uma das quais apresentava um quadro clínico com 29 semanas de gravidez. Ambas as amostras de urina foram sujeitas ao processo de hidrólise ácida. Previamente, a uma alíquota de 30 mL de urina filtrada, foi adicionado 20 mL de solução de HCl 2 M em MeOH e uma barra de teflon para agitação magnética. Por aquecimento, as amostras ficaram em digestão por aproximadamente 2 horas a 80 °C. Posteriormente, foram adicionados 20 mL de NaOH 1 M para neutralizar a amostra, e o volume ajustado a 90 mL com água ultrapura. De seguida, uma alíquota de 60 mL desta solução, foi diluída para 500 mL com água ultrapura, e ajustada a pH 5,5 estando a amostra diluída com um fator de 25 vezes. Por fim, e após todas as diluições, foram usados 25 mL para os ensaios.

4.5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.5.1. Preparação das soluções de trabalho

As soluções mãe em fungicidas, benzofenonas, parabenos, fármacos e hormonas foram preparados em MeOH, e as dos repelentes em ACN, todos com uma concentração final de 1000 mg/L. Para tal, pesaram-se rigorosamente 10,0 mg de cada padrão e dissolveram-se num balão volumétrico de 10 mL. As soluções mistura foram preparadas semanalmente a partir das soluções mãe. As soluções de trabalho e de calibração instrumental foram preparadas diariamente a partir da solução mistura através de diluição adequada. Todas as soluções padrão foram armazenadas e conservadas a -20 °C. No caso dos fungicidas, os padrões controlo e de calibração instrumental foram preparados por evaporação prévia do MeOH até à secura sob corrente suave de azoto puro (> 99,5 %) e redissolvidos em AcEt.

4.5.2. Condições de operação instrumental

Para a obtenção das melhores condições instrumentais do HPLC-DAD e GC-MS, foram analisados todos os padrões individualmente, de modo a conhecer os parâmetros instrumentais característicos de cada padrão, nomeadamente, o tempo de retenção, e os espectros de UV-vis por DAD e de eletroionização por MS. Para o caso particular do HPLC-DAD, todas as condições instrumentais encontram-se descritas na tabela 4.1, nomeadamente, o fluxo e composição da fase móvel, volume de injeção e comprimento de onda.

No caso dos estudos efetuados por GC-MS, recorreu-se a injeção PTV usando um *liner* preenchido com lã de vidro e arrefecido com azoto líquido, operando no modo *solvent vent*.

As condições de operação para os fungicidas foram: tempo de *vent*: 0,30 min, fluxo: 10 mL/min, pressão: 0 psi, fluxo de purga: 60 mL/min, tempo: 2 min. A temperatura do injetor foi programada desde os 20 °C (0,35 min) até aos 300 °C (3 min, isotérmica) com uma velocidade de 600 °C/min, baixando de seguida para 200 °C com uma velocidade de 50 °C/min (constante até final da análise).

Tabela 4.1 - Condições instrumentais usadas na análise dos analitos estudados por HPLC-DAD.

| Compostos | Volume de Injeção (μL) | Fluxo (mL/min) | Composição do eluente | Gradiente (min) | Comprimento de onda (λ _{máx} , nm) |
|---------------------------|------------------------|----------------|--|--|---|
| Benzofenonas ^a | 20 | 0,5 | A: H ₂ O B: MeOH | Isocrático com 75 % de B | 250 (BPF) 290 (HBP, DHB e HMB) |
| Parabenos ^a | 10 | 0,5 | A: H ₂ O B: MeOH | 0 min: 35 % B 0-10 min: 70% B 10-17 min: 70% B 17-20: 35 % B | 257 |
| Fármacos ^a | 10 | 0,5 | A: H ₂ O com 0,1 % de H ₃ PO ₄ B: MeOH | 0 min: 40 % B 0-2 min: 40% B 2-13 min: 80% B 13-18: 80 % B 18-21: 40 % B | 222 (MEB e MEF) 230 (FUR e NAP) 258 (KET) 275 (DIC) |
| Hormonas ^b | 10 | 0,5 | A: H ₂ O B: ACN | 0 min: 40 % B 0-15 min: 60% B 15-19 min: 60% B 19-22: 40 % B 22-25: 40 % B | 200 (EST, β-EST, α-EST, 17α-EE, α-EE, ETR e MES) 240 (19-NOR, NOR e PRO) |

^a Coluna Mediterranea Sea-18 (150 × 2,1 mm, 5 μm; Teknokroma, Espanha);^b Coluna Kinetex hexil-fenil (150 × 4,6 mm, 2,6 μm; Phenomenex, EUA).

As condições de operação para os repelentes foram: tempo de *vent*: 0,30 min, fluxo: 100 mL/min, pressão: 0 psi, fluxo de purga: 60 mL/min, tempo: 2 min. A temperatura do injetor foi programada desde os 20 °C (0,35 min) até aos 320 °C (3 min, isotérmica) com uma velocidade de 600 °C/min, baixando de seguida para 200 °C com uma velocidade de 20 °C/min (constante até final da análise). O volume de injeção e a velocidade de injeção foi sempre de 20 μL e 100 μL/min, respetivamente. A fase móvel usada foi hélio mantida no modo de pressão constante (pressão média: 9,80 psi).

No que respeita às temperaturas de operação do forno para os fungicidas, o programa teve início aos 80 °C (durante 1 min) subindo até aos 245 °C a 12 °C/min, subindo posteriormente até aos 285 °C (25 °C/min) e mantida constante por 13 min, com um tempo total de análise de 29,35 min. Para os repelentes, o forno foi programado desde os 100 °C (por 1 min) aumentando até aos 240 °C a

uma velocidade de 40 °C/min, subindo novamente a 4 °C/min até aos 290 °C, mantendo-se constante por 1 min, numa análise total de 18,00 min.

As temperaturas da linha de transferência, fonte de ionização e quadrupólo foram mantidas a 280, 230 e 150 °C, respetivamente, tendo sido selecionado um *solvent delay* de 6 min para os fungicidas e de 2 min para os repelentes.

O modo de ionização usado foi a eletroionização ou ionização eletrónica (70 eV), operando na gama de massas compreendida entre 35 e 550 Da no modo de varrimento contínuo, com uma corrente de ionização de 34,6 µA. Para operar no modo de monitorização de iões selecionados (SIM), diversos fragmentos característicos de cada analito foram monitorizados em janelas de tempo definidas de acordo com o correspondente tempo de retenção e correspondente espectro de massa, usando um *dwell time* de 100 ms.

4.5.3. Determinação do pH_{PZC}

A caracterização química superficial dos ACs foi efetuada através da determinação do pH no qual a carga à superfície do carvão é nula (pH_{PZC}). Do ponto de vista experimental, este parâmetro é determinado por intermédio da titulação mássica reversa [1, 2]. Previamente, a água ultrapura foi desarejada sob uma corrente de azoto gasoso para eliminação do CO₂. Posteriormente, são colocados em frascos com volume apropriado, as misturas constituídas por 1, 2, 6, 8 e 10 % (m/v) dos ACs juntamente com água ultrapura. Estas misturas foram borbulhadas e seladas em azoto, para eliminar eventuais interferências nomeadamente o CO₂. Após agitação durante 24 horas sob agitação magnética à temperatura ambiente, o pH das soluções foi medido. O pH_{PZC} final, correspondente ao pH do patamar de equilíbrio obtido, tendo sido estimado por representação gráfica do pH em função da fração mássica do AC.

4.5.4. Preparação dos dispositivos para microextração - BApE

A preparação de todos os dispositivos analíticos foi efetuada *home-made*, com recurso a tecnologia de colagem apropriada [3]. A obtenção da geometria cilíndrica em forma de barra, foi obtida revestindo pequenas barras em PPP com adesivo adequado, sendo posteriormente revestido com o material sorvente finamente dividido. Os dispositivos BApE convencionais possuíam comprimento de 15 mm e diâmetro de 3 mm. Os dispositivos miniaturizados, ou seja, com metade do comprimento, possuíam comprimento de 7,5 mm e diâmetro de 3 mm.

4.5.5. Procedimento para extração

Para se efetuar os ensaios de microextração, nomeadamente para os estudos sistemáticos no processo de otimização das metodologias, eram medidos 25 mL de água ultrapura para frascos de vidro com capacidade de 25 mL e introduzida uma barra de agitação magnética em teflon. Posteriormente, era colocado na solução o dispositivo de microextração, sendo a água fortificada com volume adequado a partir duma solução padrão mistura de concentração desejada e o frasco selado rapidamente. De seguida, a microextração era promovida por força de agitação magnética a uma determinada velocidade e tempo de extração à temperatura ambiente (25 °C). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado. Foram igualmente realizados ensaios em branco, que correspondem a todo o processo experimental descrito, mas usando água ultrapura sem qualquer fortificação.

4.5.6. Procedimento para retroextração

No passo da retroextração, o dispositivo de microextração foi retirado do frasco de amostragem e seco em papel limpo. De seguida, efetuaram-se três procedimentos para dessorção líquida (LD):

- *Fungicidas e benzofenonas* - o dispositivo de microextração foi introduzido num vial contendo 1,5 mL de solvente;
- *Inseticidas repelentes e parabenos* - o dispositivo de microextração foi introduzido num *insert* contendo 200 µL de solvente, colocado no interior dum vial de 1,5 mL;
- *Fármacos e hormonas* - o dispositivo de microextração foi introduzido num *insert* contendo 100 µL de solvente, colocado no interior dum vial de 1,5 mL.

Os dispositivos de microextração, ao serem colocados no solvente para a retroextração, devem ficar imersos e o vial deve ser rapidamente selado, e proceder-se a tratamento ultrassónico por um período de tempo otimizado. Posteriormente, o dispositivo de retroextração é retirado, sendo que no caso dos fungicidas e benzofenonas o extrato foi ainda evaporado à secura sob corrente suave de azoto gasoso, reconstituído com 200 µL de solvente apropriado e selado; nos restantes estudos, após ser retirado o dispositivo de microextração, o vial era rapidamente selado. Seguidamente ao passo de retroextração, os extratos contidos nos vials, eram analisados por GC-MS e/ou HPLC-DAD, consoante o tipo de analitos em estudo. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

4.5.7. Validação das metodologias

O processo experimental de validação das metodologias, nomeadamente a calibração do método, limiares analíticos, repetibilidade no mesmo dia

(precisão) e em dias diferentes (precisão intermédia), foi muito semelhante à secção anterior. No entanto, na validação são efetuados ensaios convencionais com diferentes níveis de concentração, os quais são realizados nas condições experimentais otimizadas. Foram igualmente realizados ensaios em branco, que correspondem a todo o processo experimental descrito, mas usando água ultrapura sem qualquer fortificação. Todos os ensaios relativos à validação foram efetuados em triplicado.

4.5.8. Aplicação a matrizes reais

A aplicação das presentes metodologias em amostras reais, foi igualmente semelhante ao descrito na secção 4.5.5 e 4.5.6. Nestes ensaios, eram utilizadas condições experimentais otimizadas, com as amostras reais descritas na secção 4.4. A aplicação nas amostras é efetuada com recurso ao SAM, para efeitos de quantificação dos analitos em estudo, por forma a suprimir eventuais efeitos de matriz. Todos os ensaios em amostras reais foram efetuados em triplicado e efetuados os ensaios em branco da amostra, isto é, sem qualquer tipo de fortificação.

4.6. REFERÊNCIAS

1. Mestre, A. S.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Carvalho, A. P.; Activated carbons for the adsorption of ibuprofen. *Carbon*, 45 (2007) 1979-1988.
2. Noh, J. S.; Schwarz, J. A.; Estimation of the point of zero charge of simple oxides by mass titration. *Journal of Colloid Interface Science*, 130(1) (1989) 157-164.
3. Neng, N. R.; Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; Adsorptive micro-extraction techniques - Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7303-7310.

CAPÍTULO 5

**COMPARAÇÃO DA SELETIVIDADE DE
DIFERENTES FASES SORVENTES PARA
MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA EM BARRA
– APLICAÇÃO NA ANÁLISE VESTIGIAL
DE FUNGICIDAS EM MATRIZES REAIS**

[1]

5.1. NOTA INTRODUTÓRIA

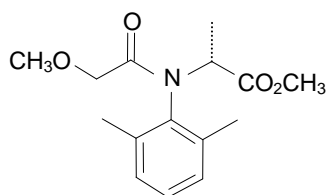
De uma forma geral, os pesticidas são substâncias usadas para proteção ou controlo a ataques de microrganismos, doenças ou pragas, em diversas atividades, nomeadamente na área agrícola e para uso doméstico. Os fungicidas são uma classe particular pertencente ao grande grupo dos pesticidas. A ocorrência de diversas doenças em vinhas provocadas por fungos, nomeadamente a escoriose, míldio, oídio, entre outras, faz com que estas substâncias sejam utilizadas para tratamento, ou simplesmente para controlo ou prevenção. A não utilização dos fungicidas, poderá provocar no setor agrícola, nomeadamente na atividade vitivinícola, graves perdas económicas. No entanto, como consequência, uma das grandes preocupações nesta área, reside na possibilidade dos fungicidas não serem convenientemente eliminados durante o processo de fabrico do vinho. Todavia, mesmo quando cumprindo as doses de aplicação de acordo com as características dos fungicidas em uso, os tempos de tratamento adequadas na vinha, e mesmo aplicando as boas práticas durante todo o processo de produção do vinho, a presença destas substâncias tem sido relatada, podendo tornar-se num problema sério de saúde pública [2-10].

A presença dos fungicidas no meio aquático, é uma consequência natural igualmente preocupante e que tem igualmente tomado a atenção da comunidade a nível mundial. Da mesma forma, a presença persistente dos fungicidas no meio ambiente, pode ter impacto ao nível da saúde nos humanos e no ambiente em geral, com a possibilidade da ação como desregulador endócrino [3, 7, 11, 12]. Atualmente, os limites permitidos em águas para consumo humano é de 0,1 µg/L para cada fungicida individual, e de 0,5 µg/L para a soma total [13]. No que respeita aos vinhos e, de acordo com o nosso conhecimento, presentemente ainda não estão definidos níveis para o respetivo controlo em Portugal [9, 14].

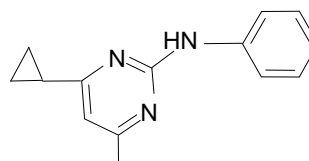
Devido aos baixos níveis de fungicidas encontrados em matrizes reais, a monitorização destes analitos requer metodologias analíticas adequadas, e que normalmente consistem em processos de enriquecimento analítico prévio à análise instrumental, normalmente por GC, HPLC ou técnicas hifenadas (GC-MS ou LC-MS) [2, 3, 6, 8-10, 12, 15-24].

Atualmente, as técnicas de preparação sortiva são das mais usadas, tendo sido aplicadas com sucesso na análise de fungicidas. Apesar da SPE necessitar de grandes quantidades de amostra, e de considerável quantidade de solventes orgânicos, continua a ser usada com frequência [8, 23, 25, 26]. A SPME [9, 27-29] e a SBSE [17, 30], têm ganho espaço na análise de fungicidas, não só por serem técnicas *solventless* e ambientalmente mais favoráveis, mas também para aumento do nível de sensibilidade e seletividade. No caso particular da SBSE, esta técnica tem sido aplicada na análise de analitos de diversas classes em vários tipos de matrizes [31-37], incluindo amostras de vinho [30, 38, 39]. No entanto, quando estão em estudo analitos com características mais polares ($\log K_{OW} < 3,0$), a SBSE(PDMS) evidencia grandes limitações no enriquecimento eficiente dos mesmos.

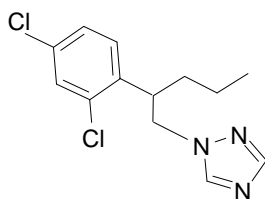
Nesta perspectiva, o presente estudo tem como objetivo aplicar e demonstrar a abrangência da técnica de microextração adsortiva em barra (BA μ E) [40], como alternativa a outras técnicas de enriquecimento analítico. Com esta nova abordagem analítica, pretende-se neste estudo discutir a aplicação da BA μ E prévia à análise por LVI-GC-MS(SIM), para a determinação de dez fungicidas modelo (azoxistrobina, difenoconazol, metalaxil, miclobutanil, penconazol, tebuconazol, flusilazol, ciprodinil, procimidona e benalaxil) em matrizes reais e cujas estruturas químicas se encontram reproduzidas na figura 5.1. Para o efeito, foram efetuados ensaios de otimização, que consistiram na comparação de diversos sorventes, interações e técnicas analíticas, bem como na avaliação de parâmetros experimentais, nomeadamente, no desenvolvimento, validação e aplicação da metodologia proposta em matrizes de águas e vinhos.



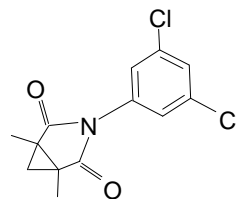
Metalaxil (MET)



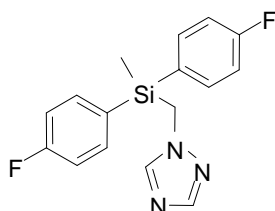
Ciprodinil (CYP)



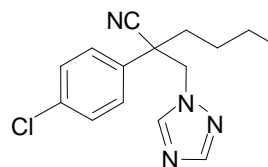
Penconazol (PEN)



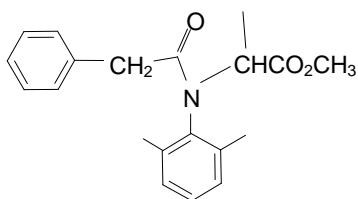
Procimidona (PROC)



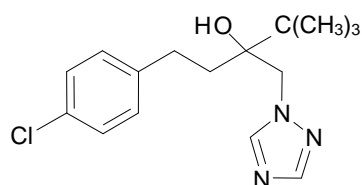
Flusilazol (FLU)



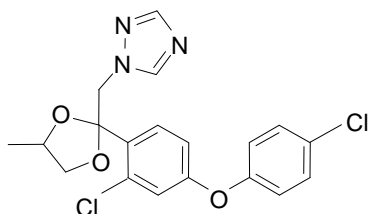
Miclobutanil (MYC)



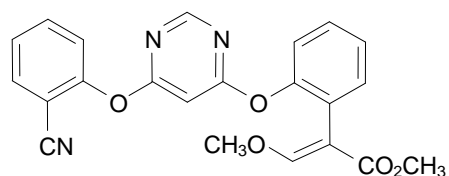
Benalaxil (BEN)



Tebuconazol (TEB)



Difenoconazol (DIF)



Azoxistrobina (AZO)

Figura 5.1 - Estruturas químicas dos dez fungicidas modelo estudados no presente estudo.

5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1. Condições de operação instrumental

De forma a obter as melhores condições de operação instrumental para os dez fungicidas selecionados, começou por se injetar um padrão composto pelos dez fungicidas no sistema de GC-MS, operando no modo de varrimento contínuo (FS, *full-scan*). Dos dados obtidos, numa primeira fase avaliou-se o padrão de fragmentação característico de cada fungicida, selecionando o ião alvo (pico base) e os principais fragmentos, de modo a alcançar a melhor seletividade e sensibilidade, para posterior operação no modo SIM, de acordo com trabalhos anteriores [20]. Na tabela 5.1, estão presentes os dados instrumentais para cada fungicida. É igualmente de realçar, as características distintas de cada analito, tanto ao nível do pK_a , como da polaridade envolvida ($1,76 \leq \log K_{OW} \leq 5,13$).

Tabela 5.1 - Log K_{OW} , pK_a , iões e tempos de retenção (t_R), para os dez fungicidas em estudo obtidos por LVI-GC-MS(SIM).

| Fungicidas | log K_{OW} ^a | pK_a ^a | Iões ^b (m/z) | t_R (min) |
|------------|---------------------------|---------------------|----------------------------|----------------|
| MET | 1,76 | 1,41 | <u>206</u> , 249, 279 | 13,0 |
| CYP | 4,00 | 3,09 | <u>224</u> , 210, 226 | 14,2 |
| PEN | 4,64 | 2,80 | <u>248</u> , 159, 250 | 14,4 |
| PROC | 2,93 | -2,67 | <u>283</u> , 285, 96 | 14,7 |
| FLU | 3,70 | 2,91 | <u>233</u> , 206, 315 | 15,6 |
| MYC | 3,07 | 2,30 | <u>179</u> , 288, 206 | 15,7 |
| BEN | 3,26 | 1,52 | <u>148</u> , 325, 266 | 16,2 |
| TEB | 3,77 | 13,70/3,27 | <u>250</u> , 125, 252 | 16,8 |
| DIF | 4,92 | 3,06 | <u>323</u> , 265, 325 | 21,7 |
| AZO | 5,13 | -0,67 | <u>344</u> , 388, 403 | 22,9 |

^a Cálculos efetuados usando o Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.19 (© 1994-2011 ACD/Labs);

^b Iões de quantificação (sublinhados) e iões qualificadores (fragmentos).

Operando nestas condições instrumentais, a monitorização dos iões selecionados mostrou resposta instrumental adequada para cada analito, assim como picos simétricos, permitindo obter tempo analítico adequado (< 25 min).

Posteriormente, com recurso à injeção de grandes volumes (LVI) operando no modo *solvent vent* por GC-MS(SIM), permitiu aumento de sensibilidade. Por conseguinte, um volume de injeção de 20 µL foi selecionado para aumento de sensibilidade, uma vez volumes superiores gerarem ruído elevado devido ao solvente, e consequentemente sensibilidade reduzida [31]. De seguida, foi determinada a sensibilidade instrumental por intermédio dos LODs e LOQs, determinados pela injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos, calculados através da razão sinal/ruído (S/N) igual a 3 e 10, respetivamente. Neste sentido, obtiveram-se valores compreendidos entre 0,2 e 1,0 µg/L para os LODs, e de 0,7 a 3,3 µg/L para os LOQs. De seguida, foi efetuada a calibração instrumental com recurso a injeção de padrões de calibração compostos pelos dez fungicidas, abrangendo concentrações compreendidas entre 1,0 e 250,0 µg/L. Nesta gama, obtiveram-se boas linearidades para todos os fungicidas, com coeficientes de determinação superiores a 0.9966. A precisão instrumental foi igualmente avaliada através de injeções repetidas de padrões, e que mostrou valores inferiores a 14,1 %, expressos em RSD. A injeção de solvente sem nenhum dos analitos em estudo, demonstrou a não existência de efeitos de memória.

5.2.2. Otimização da eficiência da BAµE-LD

Durante a implementação de qualquer metodologia analítica, é necessária a otimização de vários parâmetros que podem afetar a eficiência de recuperação dos analitos em estudo, por forma a se alcançar o máximo desempenho possível. Neste sentido, foram realizados ensaios sistemáticos em água ultrapura fortificada (0,8 µg/L) contendo os dez fungicidas, com o objetivo de otimizar os parâmetros experimentais que podem influenciar de modo decisivo a eficiência da BAµE-LD, nomeadamente a seleção do material sorvente, tempo de extração e agitação, o pH, força iónica e polaridade da matriz, assim como o

tipo de solvente e tempo de retroextração, de acordo com trabalhos anteriores [31-37, 41-45].

5.2.2.1. Seleção do material sorvente

Numa primeira fase, foram testados vários sorventes de modo a conseguir a melhor seletividade e eficiência dos dez fungicidas alvo. Deste modo, dois ACs (AC1 e AC2) e três polímeros (P1, P2 e P3), foram testados como fases sorventes para a microextração dos fungicidas com recurso à BA μ E. Duma forma geral, a seletividade evidenciada pelos sorventes depende do pH da matriz aquosa. Os ACs são materiais sólidos de natureza porosa, que retêm os analitos através de interações electroestáticas e/ou dispersivas, de acordo com as propriedades texturais, área superficial e dimensão dos poros [46]. Por outro lado, entre os polímeros testados, a retenção dos analitos depende das propriedades físicas, nomeadamente do tamanho de partícula, poro e área superficial, mas também do tipo de mecanismos de interação envolvidos, nomeadamente de tipo π - π , dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio e iónicas. A fase de PDMS foi igualmente testada, através da SBSE comercial, a qual é uma técnica de microextração que se encontra bem estabelecida em termos de técnica analítica de enriquecimento, tendo sido usada para comparação da seletividade e eficiência dos dez fungicidas em estudo. O PDMS é uma fase sorvente à base de silicone, que é caracterizada por promover interações hidrofóbicas, sendo os mecanismos de retenção essencialmente compostos por forças de *van-der-Waals*. Nesta técnica, durante o processo de microextração a barra encontra-se imersa no fundo do frasco de extração, promovendo simultaneamente o enriquecimento e agitação magnética [46, 47]. Pelo contrário, no caso da tecnologia de amostragem por flutuação, a BA μ E é constituída por materiais menos densos que a água, favorecendo a sua flutuação abaixo do *vortex* gerado pelo movimento rotacional da barra de teflon, durante o processo de enriquecimento [40]. A figura 5.2 compara as eficiências médias obtidas para todos os materiais sorventes testados e para as duas técnicas de microextração usadas, isto é, SBSE(PDMS) e BA μ E(AC1, AC2, P1, P2 e P3), para os analitos em estudo em água ultrapura, sob condições experimentais padrão.

Considerando as características dos analitos em estudo presentes na tabela 5.1, estas vão influenciar os mecanismos de interação com os sorventes, assim como a seletividade e eficiência, sob as condições experimentais padrão. No caso dos AC1 e AC2, as interações destes com os analitos são influenciadas pela dimensão dos poros, textura e pH_{PZC} do material em questão. Por outro lado, nos polímeros P1, P2, P3 e PDMS, as interações com os analitos são influenciadas pelas características físico-químicas dos mesmos, nomeadamente a polaridade.

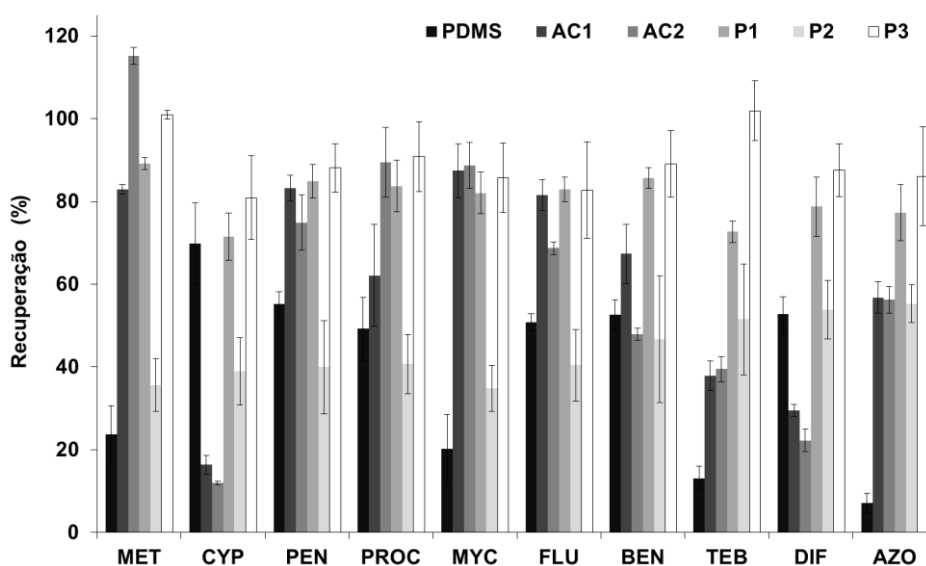


Figura 5.2 - Recuperação média obtida com fases sorventes e técnicas diferentes para os dez fungicidas em estudo, por BA μ E-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM). Condições - extração: 25 mL (0,8 μ L), 700 rpm, 4 h, pH 5,5; LD: 1,5 mL, ACN, 15 min de tratamento ultrassónico.

Enquanto os ACs apresentam áreas superficiais semelhantes, estes possuem pH_{PZC} distintos, sendo AC1 tendencialmente neutro (6,5) e o AC2 básico (10,6). Deste modo, a pH 5,5 ambos os ACs apresentam carga positiva, o que poderá condicionar as interações electrostáticas e/ou dispersivas com os fungicidas em estudo. Observando os dados obtidos na figura 5.2, recuperações aceitáveis são obtidas pelos carvões AC1 e AC2, exceto para o CYP, TEB e DIF que apresentam recuperações abaixo dos 40 %. Entre os polímeros testados, P1 e P3 mostraram em geral melhor eficiência quando comparados com P2, PDMS, AC1 e AC2. De acordo com os princípios teóricos da SBSE(PDMS), esta fase polimérica é especialmente dedicada para analitos apolares ($\log K_{OW} \geq 3$) que se

apresentem na sua forma molecular neutra, favorecendo as interações hidrofóbicas [47]. Para o caso particular do PDMS, são obtidas recuperações razoáveis, exceto para o MET, MYC, TEB e AZO (< 25 %).

Entre os polímeros estudados, P1 e P2 são constituídos pela mesma estrutura, baseada em PS-DVB, onde P2 apresenta sempre recuperações inferiores (< 50 %), o que pode ser devido à reduzida área superficial evidenciada por este polímero comparativamente a P1. Por outro lado, P3 mostrou recuperações superiores quando comparado com P1, para a maioria dos fungicidas em estudo, apesar de P3 possuir uma área superficial inferior a P2. Para as fases P1 e P2, os mecanismos de retenção parecem ser “dominados” por interações π - π , devido à presença de anéis aromáticos nos sorventes e nos fungicidas em estudo, e em alguns casos de ligações por pontes de hidrogénio. De qualquer modo, P1 e P3 mostraram ser os sorventes de eleição para a microextração dos fungicidas, uma vez terem demonstrado eficiências superiores a 70 %. O P3 em particular evidenciou melhores recuperações para todos os fungicidas em estudo, tendo uma estrutura baseada em PS-DVB modificada. Esta estrutura oferece múltiplos mecanismos de retenção, nomeadamente interações π - π , ligações de hidrogénio e dipolo-dipolo, abrangendo assim uma gama alargada de seletividade, sendo decisivo para a microextração dos fungicidas os quais possuem estruturas diversificadas, bem como $\log K_{OW}$ e pK_a variados.

Deste modo, demonstrou-se que a BA μ E é uma técnica analítica poderosa e versátil, que permite selecionar o material sorvente mais adequado para cada caso em particular, o que evidencia ser uma grande vantagem quando comparada com outras técnicas de microextração. Para este estudo, o polímero P3 apresentou a melhor seletividade e recuperações médias superiores a 80 % para os dez fungicidas, tendo sido selecionado para o estudo da otimização.

5.2.2.2. Estudo dos parâmetros da LD

O passo da retroextração é decisivo, uma vez que tem de ser selecionado o solvente adequado com a força suficiente para promover a libertação completa

dos fungicidas do material sorvente, a qual é auxiliada com recurso a tratamento ultrassónico [41-45]. Assim, foram testados solventes (1,5 mL) nomeadamente ACN, MeOH, misturas de ACN/MeOH (1:1, v/v) e *n*-C5, abrangendo uma gama de polaridade alargada para a retroextração completa dos fungicidas da fase P3. A figura 5.3 mostra as recuperações obtidas para os solventes testados, onde é notório que melhores eficiências são alcançadas com ACN/MeOH (1:1, v/v), sendo este escolhido para prosseguir com o estudo.

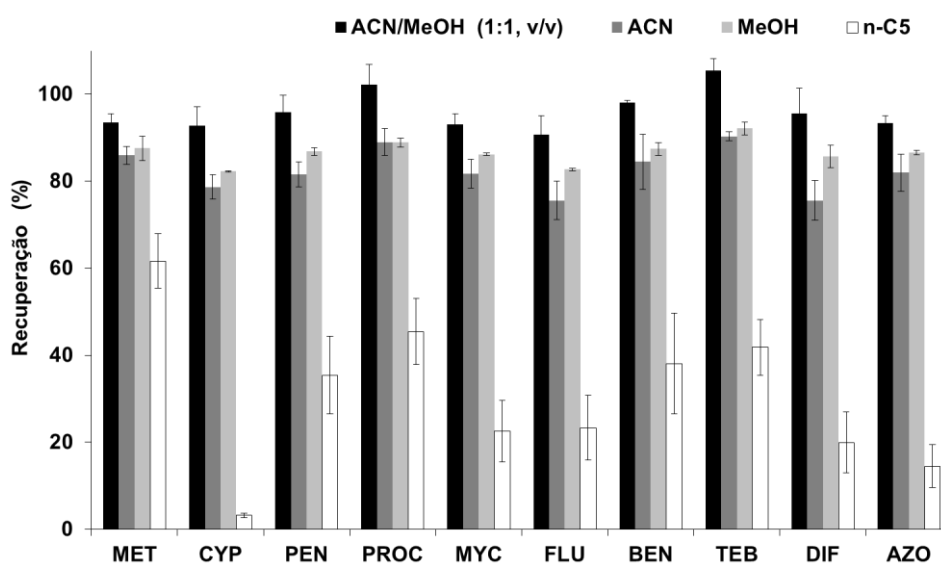


Figura 5.3 - Efeito do solvente na retroextração da BAμE(P3). Condições - extração: 25 mL (0,8 μL) 700 rpm, 4 h, pH 5,5; LD: 1,5 mL, 15 min de tratamento ultrassónico.

O tempo de ultrassons é igualmente importante, por forma a garantir o tempo necessário para a completa remoção dos analitos em estudo da fase sorvente. Para tal, tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos foram testados (dados não apresentados), e dos resultados obtidos verifica-se que o tempo de 15 minutos é suficiente para se obter a remoção completa dos fungicidas da fase P3, tendo sido selecionado para estudos posteriores.

Para averiguar possíveis retenções na BAμE(P3) e/ou efeitos de memória ou *carryover*, foram efetuadas retroextrações consecutivas das mesmas barras de microextração e injetadas no GC-MS, onde se verificou que o ruído existente foi sempre inferior aos LODs determinados. O passo de evaporação pode ser decisivo, uma vez que podem ocorrer perdas por evaporação dos fungicidas em

estudo durante a troca de solvente. Deste modo, misturas de fungicidas ao nível de 0,8 µg/L foram evaporados à secura através de fluxo suave de azoto gasoso, e posteriormente redissolvidos em 200 µL de AcEt, seguida de análise por LVI-GC-MS(SIM). Das análises obtidas e por comparação com os padrões controlo, perdas negligenciáveis foram observadas, com recuperações que oscilaram entre 99,6 % (PROC) e 111,7 % (TEB), tendo uma precisão compreendida entre 1,4 % (AZO) e 5,4 % (MET). Assim, o passo de evaporação não revelou ser um passo limitativo para a análise dos fungicidas através da metodologia proposta.

5.2.2.3. Estudo dos parâmetros da BAµE(P3)

Sendo que o processo de microextração é baseado no equilíbrio entre os analitos na matriz aquosa e a fase polimérica, são vários os parâmetros normalmente estudados e otimizados suscetíveis de afetar a eficiência da microextração, englobando a velocidade de extração, o tempo de equilíbrio, o pH, polaridade e força iónica da matriz.

O primeiro parâmetro a ser estudado foi o tempo de extração, sendo um dos mais importantes e decisivo no processo de microextração, o qual limita a cinética dos analitos entre as fases envolvidas, e consequentemente, a eficiência da extração da BAµE(P3). Assim, foram efetuados ensaios envolvendo tempos de equilíbrio desde 1 a 4 h para os fungicidas em estudo. A figura 5.4 mostra o perfil obtido para o estudo do tempo de extração, onde se observa que para 3 horas são obtidas excelentes recuperações para o PROC, BEN, TEB e AZO. No entanto, para os restantes fungicidas são necessárias 4 h para se alcançar máxima eficiência, e como tal foram selecionadas 4 h para estudos posteriores, apresentando RSD inferiores a 12 % (TEB).

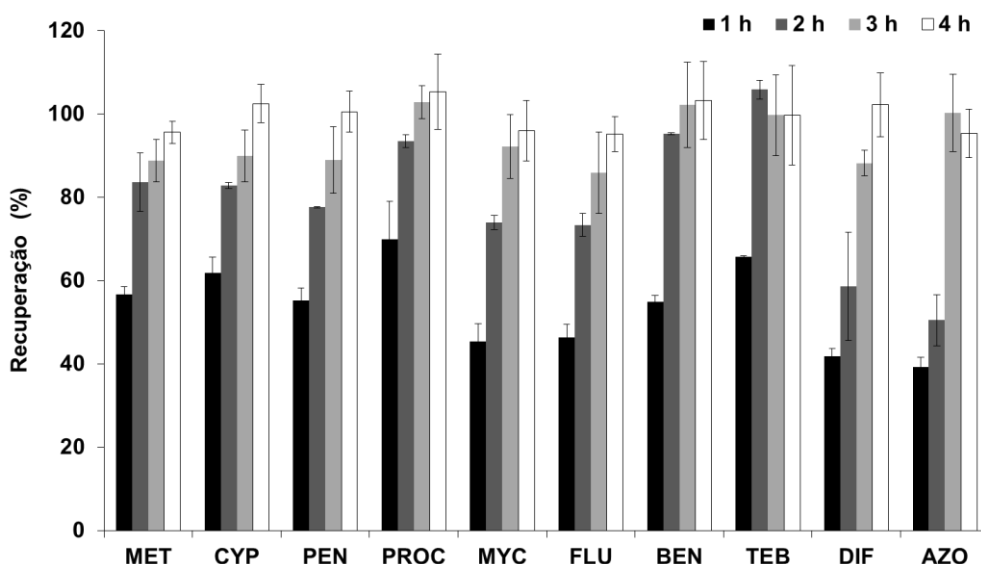


Figura 5.4 - Efeito do tempo de extração na eficiência da BAμE(P3). Condições - extração: 25 mL (0,8 μg/L), 700 rpm, pH 5,5; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 minutos de tratamento ultrassônico.

Seguidamente, a velocidade de agitação foi o parâmetro a ser estudado. Este parâmetro pode afetar a eficiência no processo de enriquecimento, uma vez que influencia a transferência de massa dos fungicidas para a fase polimérica [47]. Dependendo do tamanho das barras magnéticas, velocidades elevadas (> 1000 rpm) são normalmente evitadas, uma vez que ao gerar turbulência perturba o dispositivo de microextração que se encontra junto ao *vortex*, podendo levar a eficiências e precisões reduzidas [33, 35, 36]. A figura 5.5 mostra o perfil obtido, onde se verifica uma pequena vantagem para 1000 rpm, tendo sido escolhida para os ensaios seguintes.

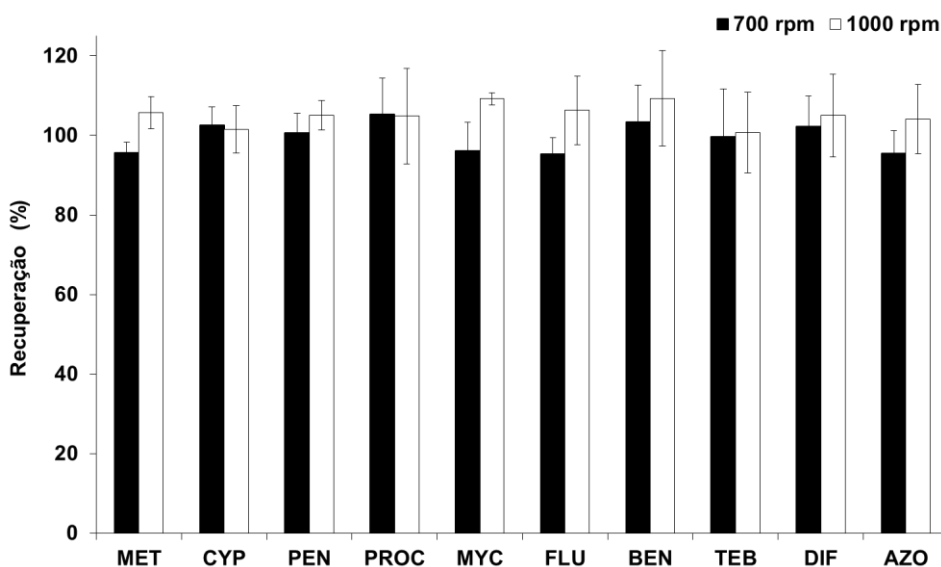


Figura 5.5 - Efeito da velocidade de agitação na eficiência da BAμE(P3). Condições - extração: 25 mL (0,8 μg/L), 4 h, pH 5,5; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 minutos de tratamento ultrassônico.

As características da matriz têm enorme importância, nomeadamente o pH, força iónica e polaridade, e como tal foram igualmente estudadas. No caso do pH, foram testados diversos valores, nomeadamente a 2,0, 5,5, 8,0 e 11,0, para averiguar o efeito na eficiência da extração da BA μ E(P3). O efeito do pH é de extrema importância, uma vez que determina o estado molecular dos analitos, assim como a afinidade dos mesmos para a fase polimérica. A figura 5.6, mostra os dados obtidos para o efeito de pH, onde melhores recuperações são alcançadas para pH 5,5, sendo que nos restantes valores de pH testados ocorre redução da eficiência. Assim, é necessário o controlo do pH da matriz, por forma a facilitar a migração dos analitos para a fase polimérica.

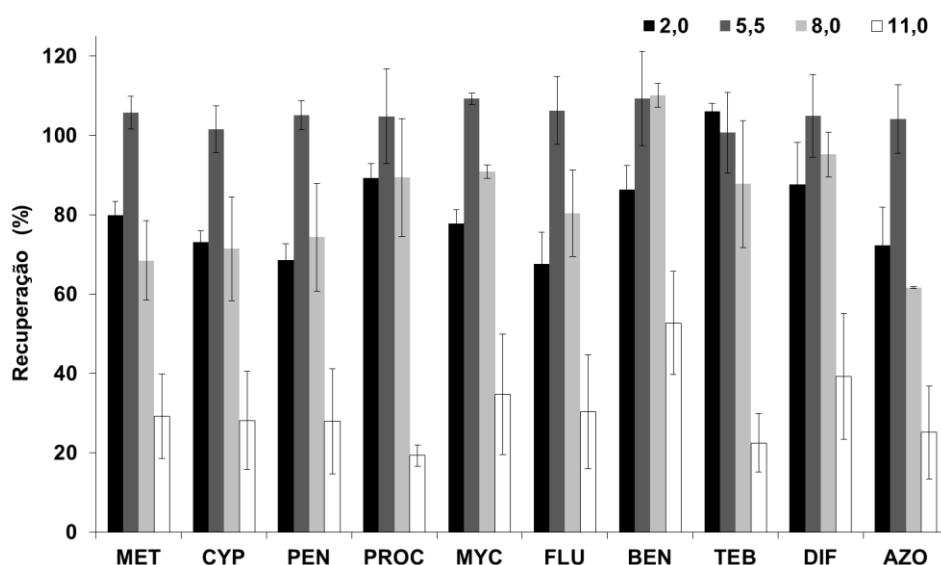


Figura 5.6 - Efeito do pH na eficiência da BA μ E(P3). Condições - extração: 25 mL (0,8 μ g/L), 1000 rpm, 4 h; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 minutos de tratamento ultrassónico.

Relativamente à força iónica, este parâmetro pode ter grande efeito na eficiência da microextração, nomeadamente para compostos com características mais polares ($\log K_{OW} < 3$), favorecendo a migração dos analitos alvo para a fase polimérica. O efeito da adição dum eletrólito aumenta, em geral, a eficiência da extração, uma vez que o *salting-out* se baseia na redução da solubilidade dos analitos na matriz aquosa [33, 34, 42, 44, 46]. Assim, este efeito foi avaliado através da adição de NaCl com 5, 10 e 15 % (p/v), tendo ocorrido redução na recuperação a 10 % e 15 % de NaCl para todos os fungicidas, e a 5 % somente para MYC, FLU e AZO, como mostra a figura 5.7.

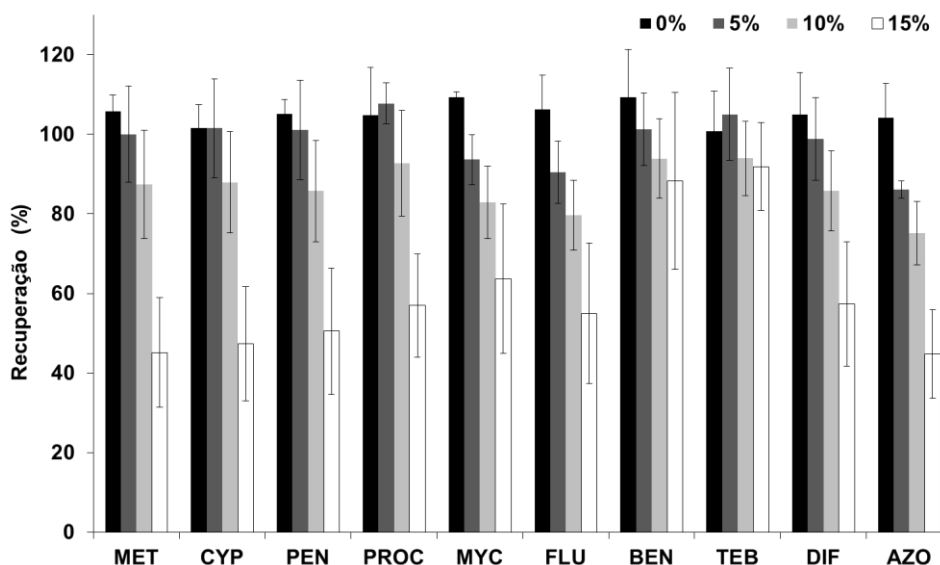


Figura 5.7 - Efeito da força iônica na eficiência da BAμE(P3). Condições - extração: 25 mL (0,8 µg/L), 1000 rpm, 4 h; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 minutos de tratamento ultrassônico.

O último parâmetro a ser testado, foi a polaridade da matriz. Esta variável tem particular importância quando se estudam analitos com características mais apolares ou hidrofóbicas, uma vez que estes podem ser adsorvidos pelo vidro do frasco de amostragem, sendo este fenómeno designado de *wall-effect*, originando a redução da eficiência da extração [31, 34, 36, 37, 46]. Deste modo, usaram-se diferentes composições de MeOH em água, contendo 5, 10 e 15 % (v/v), tendo-se verificado ligeira redução na recuperação (dados não apresentados), nomeadamente para o MET e TEB. Desta forma, para ensaios posteriores não foi adicionado qualquer conteúdo em MeOH.

5.2.3. Validação da metodologia BAμE(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM)

Depois de se estabelecer as condições experimentais otimizadas, procedeu-se à validação da metodologia proposta para a análise de fungicidas. Deste modo, os ensaios posteriores foram efetuados nas seguintes condições otimizadas: extração - 25 mL, 1000 rpm, 4 h, pH 5,5; LD - 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 minutos sob tratamento ultrassônico. Dos resultados obtidos da calibração do método, obtiveram-se boas linearidades com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9980 numa gama de concentrações

compreendida entre 0,04 e 1,6 µg/L, tendo-se observado precisões inferiores a 14,4 % (DIF, 0,2 µg/L). A sensibilidade foi igualmente averiguada através da determinação dos limiares analíticos, com os LODs a variarem entre 4 e 30 ng/L, e os LOQs entre 13 e 99 ng/L. No que respeita à recuperação otimizada, ensaios realizados em água ultrapura fortificada (0,8 µg/L), obtiveram-se eficiências médias compreendidas entre 100,0 ± 7,1 % (CYP) e 107,8 ± 10,9 % (BEN), e precisões inferiores a 11,5 % (PROC). A tabela 5.2 resume todos os dados obtidos na validação, nomeadamente eficiência média, limiares analíticos, gama linear dinâmica, declive e coeficiente de determinação do método proposto, sob condições experimentais otimizadas.

Tabela 5.2 - Recuperação média, LODs, LOQs e resultados de calibração obtidos para o método BAµE(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM) para os fungicidas em estudo, sob condições experimentais otimizadas.

| Fungicidas | Recuperação ^a (% ± RSD) | LODs (ng/L) | LOQs (ng/L) | Gama de concentração (µg/L) | Declive | r ² |
|------------|---------------------------------------|----------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------|
| MET | 100,1 ± 3,8 | 20 | 66 | 0,1 - 1,6 | 6,3 × 10 ⁵ | 0,9981 |
| CYP | 100,0 ± 7,1 | 4 | 13 | 0,04 - 1,6 | 6,0 × 10 ⁶ | 0,9991 |
| PEN | 100,1 ± 3,5 | 10 | 33 | 0,04 - 1,6 | 2,4 × 10 ⁶ | 0,9990 |
| PROC | 103,2 ± 11,5 | 20 | 66 | 0,1 - 1,6 | 1,5 × 10 ⁶ | 0,9990 |
| FLU | 102,9 ± 8,1 | 10 | 33 | 0,04 - 1,6 | 5,2 × 10 ⁶ | 0,9980 |
| MYC | 107,6 ± 1,4 | 20 | 66 | 0,1 - 1,6 | 2,0 × 10 ⁶ | 0,9983 |
| BEN | 107,8 ± 10,9 | 30 | 99 | 0,1 - 1,6 | 2,0 × 10 ⁶ | 0,9984 |
| TEB | 107,1 ± 10,1 | 20 | 66 | 0,1 - 1,6 | 9,1 × 10 ⁶ | 0,9988 |
| DIF | 103,7 ± 9,9 | 20 | 66 | 0,1 - 1,6 | 6,5 × 10 ⁵ | 0,9980 |
| AZO | 103,5 ± 8,3 | 20 | 66 | 0,1 - 1,6 | 5,2 × 10 ⁵ | 0,9986 |

^a Ensaios a 0,8 µg/L; n = 3;

A figura 5.8, mostra um fragmentograma referente a um ensaio de recuperação em água ultrapura fortificada (0,8 µg/L), obtido por BAµE(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM).

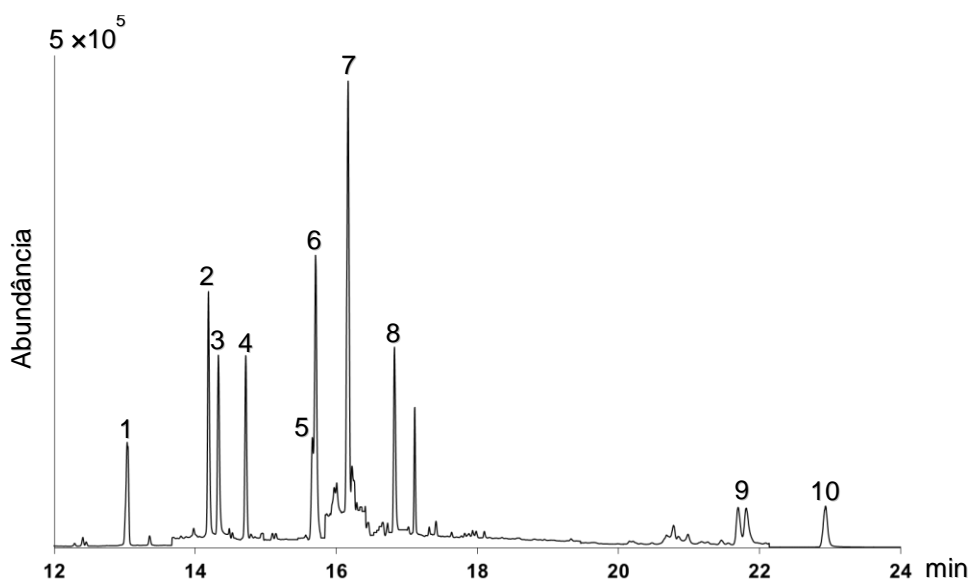


Figura 5.8 - Fragmentograma resultante de ensaio de recuperação a 0,8 µg/L, obtido por BApE(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM) sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-MET, 2-CYP, 3-PEN, 4-PROC, 5-FLU, 6-MYC, 7-BEN, 8-TEB, 9-DIF, 10-AZO.

A metodologia proposta foi igualmente avaliada, através de ensaios de repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes. Para o efeito, foram realizados ensaios em água ultrapura fortificada com níveis de 0,2, 0,4 e 1,6 µg/L, em triplicado e no mesmo dia, e para um nível de 0,8 µg/L, em triplicado e em três dias diferentes. A tabela 5.3 resume todos os dados obtidos para os ensaios da repetibilidade, expressa em recuperações médias e precisão (RSD). Dum modo geral, obteve-se boa concordância em termos da recuperação média. Relativamente à precisão, foram igualmente obtidos bons resultados, com RSD inferiores a 10,7 % (BEN) para 0,2 µg/L, 13,7 % (AZO) para 0,4 µg/L, 13,6 % (CYP) para 1,6 µg/L, e 9,9 % (TEB) para 1,6 µg/L.

Tabela 5.3 - Ensaios de repetibilidade, expressos em recuperação média e precisão respetiva expressa em RSD, obtidas pelo método BAµE(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM), para os fungicidas em estudo sob condições experimentais otimizadas.

| Fungicidas | Recuperação (% ± RSD) | | | |
|------------|-----------------------------|--------------|---|-------------|
| | Repetibilidade ^a | | Repetibilidade em dias diferentes ^b | |
| | 0,2 µg/L | 0,4 µg/L | 1,6 µg/L | 0,8 µg/L |
| MET | 106,2 ± 7,0 | 99,1 ± 7,1 | 95,1 ± 13,0 | 100,8 ± 6,1 |
| CYP | 104,5 ± 5,5 | 98,3 ± 7,2 | 97,0 ± 13,6 | 102,2 ± 7,1 |
| PEN | 103,6 ± 6,7 | 100,8 ± 11,7 | 95,4 ± 7,7 | 103,1 ± 6,6 |
| PROC | 102,0 ± 6,5 | 97,2 ± 11,2 | 97,6 ± 6,9 | 102,5 ± 9,1 |
| FLU | 100,6 ± 7,8 | 99,3 ± 8,2 | 95,8 ± 4,5 | 98,1 ± 7,9 |
| MYC | 99,6 ± 6,4 | 98,7 ± 8,9 | 96,2 ± 9,5 | 100,0 ± 7,3 |
| BEN | 96,6 ± 10,7 | 98,7 ± 9,4 | 96,3 ± 13,2 | 103,3 ± 8,5 |
| TEB | 100,5 ± 7,4 | 99,3 ± 10,6 | 96,1 ± 7,3 | 104,4 ± 9,9 |
| DIF | 98,6 ± 4,6 | 98,6 ± 7,7 | 96,4 ± 8,0 | 104,5 ± 7,0 |
| AZO | 97,1 ± 9,7 | 102,6 ± 13,7 | 96,5 ± 7,3 | 99,0 ± 6,6 |

^a n = 3;

^b Três dias consecutivos (n = 9).

5.2.4. Aplicação da metodologia BAµE(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM) a matrizes reais

A aplicação a matrizes reais, é um passo decisivo por forma a demonstrar a capacidade analítica da metodologia proposta, uma vez que estas matrizes apresentam complexidade elevada. Neste sentido, foram processadas dois tipos de amostras, nomeadamente água potável e subterrânea, assim como vinho tinto e branco. Para o propósito de quantificação e para minimizar os efeitos das matrizes complexas, recorreu-se ao SAM para os fungicidas em estudo, sendo a melhor estratégia analítica para amostras reais [33-37, 41-45]. De seguida, as amostras de água foram fortificadas com níveis de concentração desde 0,1 a 1,6 µg/L, e as amostras de vinho desde 0,4 a 1,6 µg/L, tendo sido incluído o ensaio em branco (C₀), que corresponde à amostra sem qualquer adição de padrão. A tabela 5.4 resume os resultados obtidos do SAM nas matrizes reais.

Tabela 5.4 - Declives e coeficientes de determinação obtidos através do SAM em matrizes reais para os fungicidas em estudo, pelo método BAμE(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

| Fungicidas | Água potável | | Água subterrânea | | Vinho tinto | | Vinho branco | |
|------------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|
| | Declive | r^2 | Declive | r^2 | Declive | r^2 | Declive | r^2 |
| MET | $4,6 \times 10^5$ | 0,9989 | $5,1 \times 10^5$ | 0,9973 | $1,6 \times 10^5$ | 0,9987 | $3,4 \times 10^5$ | 0,9956 |
| CYP | $4,0 \times 10^6$ | 0,9980 | $4,0 \times 10^6$ | 0,9977 | $2,0 \times 10^6$ | 0,9982 | $3,2 \times 10^6$ | 0,9988 |
| PEN | $2,0 \times 10^6$ | 0,9985 | $2,0 \times 10^6$ | 0,9963 | $2,0 \times 10^6$ | 0,9981 | $1,0 \times 10^6$ | 0,9963 |
| PROC | $1,0 \times 10^6$ | 0,9992 | $7,7 \times 10^5$ | 0,9968 | $5,3 \times 10^5$ | 0,9981 | $5,5 \times 10^5$ | 0,9970 |
| FLU | $4,0 \times 10^6$ | 0,9973 | $3,0 \times 10^6$ | 0,9966 | $2,0 \times 10^6$ | 0,9991 | $2,0 \times 10^6$ | 0,9987 |
| MYC | $1,0 \times 10^6$ | 0,9972 | $8,1 \times 10^5$ | 0,9964 | $5,8 \times 10^5$ | 0,9981 | $4,6 \times 10^5$ | 0,9982 |
| BEN | $2,0 \times 10^6$ | 0,9972 | $1,0 \times 10^6$ | 0,9976 | $1,0 \times 10^6$ | 0,9968 | $1,1 \times 10^6$ | 0,9970 |
| TEB | $2,0 \times 10^6$ | 0,9988 | $4,8 \times 10^5$ | 0,9988 | $4,1 \times 10^5$ | 0,9999 | $3,3 \times 10^5$ | 0,9969 |
| DIF | $4,7 \times 10^5$ | 0,9989 | $1,7 \times 10^5$ | 0,9979 | $1,4 \times 10^5$ | 0,9977 | $1,5 \times 10^5$ | 0,9980 |
| AZO | $4,2 \times 10^5$ | 0,9981 | $1,5 \times 10^5$ | 0,9991 | $1,3 \times 10^5$ | 0,9958 | $1,3 \times 10^5$ | 0,9982 |

Dum modo geral, foi alcançada boa linearidade nas amostras de água ($r^2 > 0,9964$) e de vinho ($r^2 > 0,9956$). Em termos de sensibilidade, relativamente às amostras de água, comparando com a calibração em água ultrapura, na água potável foram observadas pequenas diferenças, apresentando a mesma ordem de grandeza. No entanto, com a água subterrânea, apesar de se verificar o mesmo comportamento da água potável, observou-se uma redução mais acentuada na sensibilidade para os fungicidas PROC, MYC e TEB. Relativamente às amostras de vinho, comparando com a calibração em água ultrapura, o comportamento é semelhante às amostras de águas, na generalidade com pequenas diferenças, embora com redução na sensibilidade. Para os casos particulares do PROC, MYC e TEB, a redução é mais acentuada e significativa, uma vez que ocorre diminuição da ordem de grandeza. Apesar das amostras de vinho possuírem uma matriz complexa e conteúdo alcoólico, verifica-se que o processo de enriquecimento não é afetado de forma crítica, uma vez que durante o processo de otimização, nomeadamente no estudo da polaridade, se verificou que com a presença de MeOH em composições variáveis, a recuperação sofre ligeiras variações. Para o caso das amostras de

água, não foi detectado nenhum dos fungicidas em estudo ($< \text{LODs}$). No entanto, no vinho tinto foi detectado o MET com nível de $0,37 \pm 0,02 \mu\text{g/L}$, e no vinho branco foi detectado o MET e CYP com níveis de $0,40 \pm 0,04 \mu\text{g/L}$ e $1,27 \pm 0,05 \mu\text{g/L}$, respectivamente. A figura 5.9 mostra um fragmentograma sem fortificação, resultante da análise de vinho branco, assim como o espectro de massa de cada fungicida detectado, obtido através da presente metodologia, sob condições experimentais otimizadas. Estes resíduos foram confirmados através do espectro de fragmentação característico no modo FS.

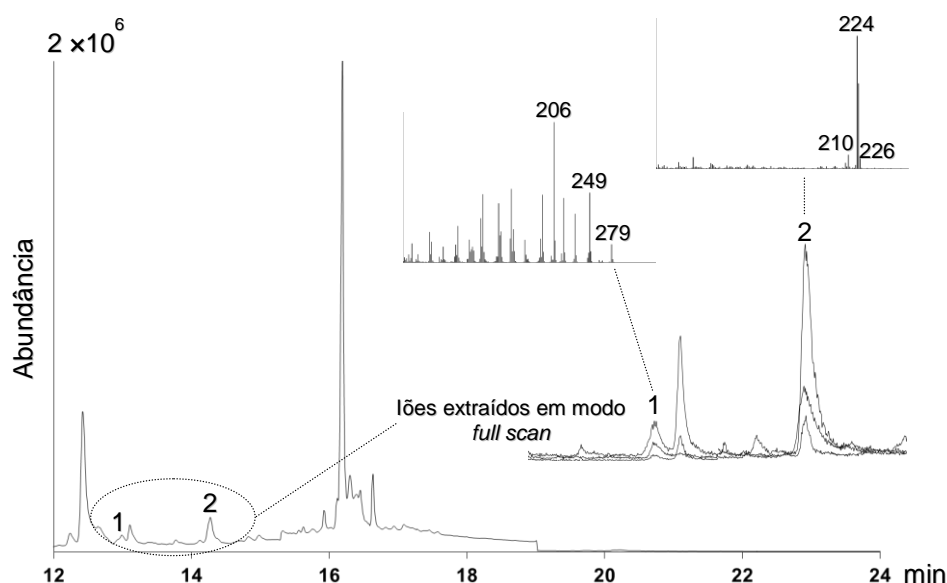


Figura 5.9 - Fragmentograma resultante dos ensaios em vinho branco, obtido por BA μ E(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM) sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-MET, 2-CYP.

5.3. CONCLUSÕES

A metodologia proposta, BA μ E(P3, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/LVI-GC-MS(SIM), foi otimizada e validada para a monitorização simultânea de dez fungicidas com diferentes características em matrizes reais. Sob condições experimentais otimizadas, o presente método mostrou excelente desempenho analítico, nomeadamente boa eficiência, precisão adequada, assim como limiares analíticos ao nível dos ppt's e boa gama linear dinâmica.

A aplicação da metodologia a matrizes reais com recurso ao SAM em amostras de águas e vinhos, demonstrou excelente comportamento analítico.

Duma forma geral, o método mostrou ser robusto, de fácil execução experimental, seletivo e sensível, para a análise de fungicidas em matrizes reais e alternativo a outras técnicas de microextração sortiva.

5.4. REFERÊNCIAS

1. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction - Application to trace level analysis of fungicides in real matrices. *Journal of Chromatography A* 1265 (2012) 7-16.
2. Huang, Y.; Zhou, Q.; Xie, G.; Development of sensitive determination method for fungicides from environmental water samples with Titanate nanotube array micro-solid phase extraction prior to high performance liquid chromatography. *Chemosphere* 90 (2013) 338-343.
3. Farajzadeh, M. A.; Khoshmaram, L.; Air-assisted liquid-liquid microextraction-gas chromatography-flame ionisation detection: A fast and simple method for the assessment of triazole pesticides residues in surface water, cucumber, tomato and grape juices samples. *Food Chemistry* 141 (2013) 1881-1887.
4. Jiménez, J. J.; Bernal, J. L.; Nozal, M. J.; Bernal, J.; Toribio, L.; Persistence and degradation of metalaxyl, lindane, fenvalerate and deltamethrin during the wine making process. *Food Chemistry* 104 (2007) 216-223.
5. Carpinteiro, I.; Ramil, M.; Rodriguez, I.; Cela, R.; Determination of fungicides in wine mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7484-7492.
6. Montes, R.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Rubí, E.; Cela, R.; Solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the sensitive determination of selected fungicides in wine. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 5459-5466.
7. Pinto, M. I.; Sontag, G.; Bernardino, R. J.; Noronha, J. P.; Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review. *Microchemical Journal* 96 (2010) 225-237.
8. Economou, A.; Botitsi, H.; Antoniou, S.; Tsipi, D.; Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 5856-5867.

9. Martins, J.; Esteves, C.; Limpo-Faria, Ana; Barros, P.; Ribeiro, N.; Simões, T.; Correia, M.; Delerue-Matos, C.; Analysis of six fungicides and one acaricide in still and fortified wines using solid-phase microextraction-gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 132 (2012) 630-636.
10. González-Rodríguez, R. M.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J.; Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 6033-6042.
11. M. Litchfield, D. Peakall, *Environmental Oestrogen's. Consequences to Human Health and Wildlife*, Institute for Environment and Health, University of Leicester, Leicester, UK, 1995.
12. Liang, P.; Wang, F.; Wan, Q; Ionic liquid-based ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of four fungicides in environmental water samples. *Talanta* 105 (2013) 57-62.
13. Directive 98/83/EC of the council of 3 of November on the quality of water intended for human consumption, Off. J. Eur. Commun. 32 (1998).
14. www.ivv.min-agricultura.pt
15. Li, Y.; Dong, F.; Liu, X.; Xu, J.; Li, J.; Kong, Z.; Chen, X.; Liang, X.; Zheng, Y; Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1224 (2012) 51-60.
16. Du, T.; Cheng, J.; Wu, M.; Wang, X.; Zhou, H.; Cheng, M.; An *in situ* immobilized pipette tip solid phase microextraction method based on molecularly imprinted polymer monolith for the selective determination of difenoconazole in tap water and grape juice. *Journal of Chromatography B*, 951-952 (2014) 104-109.
17. Margoum, C.; Guillemain, C.; Yang, X.; Coquery, M.; Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticides in water samples: Method validation and measurement uncertainty. *Talanta* 116 (2013) 1-7.
18. Zhou, Q.; Xiao, J.; Ding, Y.; Sensitive determination of fungicides and prometryn in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes solid-phase extraction cartridge. *Analytica Chimica Acta* 602 (2007) 223-228.
19. Greulich, K.; Alder, L.; Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 183-197.

20. Stajnbaher, D.; Zupancic-Kralj, L.; Optimisation of programmable temperature vaporizer-based large volume injection for determination of pesticide residues in fruits and vegetables using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1190 (2008) 316-326.
21. Zamora, O.; Paniagua, E. E.; Cacho, C.; Vera-Avila, L. E.; Perez-Conde, C.; Determination of benzimidazole fungicides in water samples on-line MISPE-HPLC. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 393 (2009) 1745-1753.
22. Cunha, S. C.; Fernandes, J. O.; Alves, A.; Oliveira, M. B. P. P.; Fast low-pressure gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 119-126.
23. Portolés, T.; Pitarch, E.; López, F. J.; Hernández, F.; Development and validation of a rapid and wine-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural waters and wastewater by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 303-315.
24. González-Rodríguez, R. M.; Cancho-grande, B.; Simal-Gándara, J.; Decay of fungicide residues during vinification of white grapes harvested after the application of some new substances against downy mildew. *Food Chemistry* 125 (2011) 549-560.
25. Fontana, A. R.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Altamirano, J. C.; Cela, R.; Solid-phase extraction followed by liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for the selective determination of fungicides in wine samples. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 2165-2175.
26. Deng, X.; Chen, X.; Lin, K.; Ding, G.; Yao, P.; Rapid and Selective Determination of Trace Benzimidazole Fungicides in Fruit Juices by Magnetic Solid-Phase Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection. *Food Analytical Methods* 6 (2013) 1576-1582.
27. Sakamoto, M.; Tsutsumi, T.; Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination of multi-class pesticides in waters. *Journal of chromatography A* 1028 (2004) 63-74.
28. Ravelo-Pérez, L. M.; Hernández-Borges, J.; Borges-Miquel, T. M.; Rodríguez-Delgado, M. A.; Solid-phase microextraction and sample stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of pesticide residues in red wines. *Food Chemistry* 111 (2008) 764-770.
29. González-Rodríguez, R. M.; Noguerol-Pato, R.; González-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J.; Application of new fungicides under good agricultural practices and their effects on the volatile profile of white wines. *Food Research International* 44 (2011) 397-403.

30. Sandra, P.; Tienport, B.; Vercammen, J.; Tredoux, A.; Sandra, T.; David, F.; Stir Bar Sorptive Extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine. *Journal of Chromatography A* 928 (2001) 117-126.
31. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 517 (2004) 21-32.
32. Alves, R. f.; Nascimento, A. M. D.; Nogueira, J. M. F.; Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Analytica Chimica Acta* 546 (2005) 11-21.
33. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Development of a stir-bar-sorptive extraction-liquid desorption-large volume injection capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2005) 1141-1151.
34. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 1303-1311.
35. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Considerations on ultra-trace analysis of phtalates in drinking water. *Water Research* 40 (2006) 2572-2582.
36. Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. *Talanta* 74 (2008) 1498-1504.
37. Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; Stir bar sorptive extraction and liquid desorption combined with large-volume injection gas chromatography-mass spectrometry for ultra-trace analysis of musk compounds in environmental matrices. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 396 (2010) 1853-1862.
38. Oliva, J.; Zalacain, A.; Payá, P.; Salinas, M. R.; Barba, A.; Effect of the use of recent commercial fungicides [under good and critical agricultural practices] on the aroma composition of Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta* 617 (2008) 107-118.
39. Viñas, P.; Aguinaga, N.; Campillo, N.; Hernández-Córdoba, M.; Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction for the ultra-performance liquid chromatographic determination of oxazole fungicide residues in wines and juices. *Journal of Chromatography A* 1194 (2008) 178-183.
40. Neng, N. R.; Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; Adsorptive micro-extraction techniques - Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7303-7310.

41. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) with *in situ* derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 3155-3163.
42. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices. *Talanta* 83 (2011) 1643-1649.
43. Neng, N. R.; Mestre, A.S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibric acid in environmental and biological matrices. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6263-6270.
44. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (2012) 1355-1364.
45. Gonçalves, A. F. P.; Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Development of a Powdered Activated Carbon in Bar Adsorptive Micro-extraction for Heroin Metabolites Analysis. *Journal of Chromatographic Science*. 50 (2012) 574-581.
46. Nogueira, J. M. F.; Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta* 757 (2012) 1-10.
47. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.; Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous sample: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separation* 11 (1999) 737-747.

CAPÍTULO 6

**DETERMINAÇÃO VESTIGIAL DE FILTROS
UV DO TIPO BENZOFENONA EM
MATRIZES REAIS POR MICROEXTRAÇÃO
ADSORTIVA EM BARRA USANDO FASES
SORVENTES SELETIVAS [1]**

6.1. NOTA INTRODUTÓRIA

A preocupação relativa à exposição solar por parte dos humanos e à redução da camada de ozono devido aos elevados níveis de poluição, assim como a todos os riscos associados, tem aumentado o uso de produtos de higiene e cuidado pessoal que contêm filtros ultravioleta (UV) nas últimas décadas, sendo uma classe de compostos denominados de emergentes. A variedade de produtos que contêm estas substâncias são muitos, nomeadamente protetores solares, loções hidratantes, *aftershave*, lacas, shampoo, batons, entre outros. Este uso deve-se, principalmente, a atividades aquáticas, nomeadamente em praias e piscinas, mas também à crescente preocupação no cuidado da pele, e consequentemente, o aumento do uso de produtos cosméticos [2-4].

O primeiro protetor solar a ser comercializado, foi desenvolvido na década 1930 para proteção contra os raios UV do tipo B (UV-B), para prevenção de queimaduras solares. Alguns anos mais tarde, na década de 1970, foram desenvolvidos protetores solares mais eficazes, para proteção contra os raios UV do tipo A e B, devido aos elevados riscos de desenvolvimento de cancro maligno durante a exposição solar, fotossensibilidade e envelhecimento prematuro da pele, assim como a destruição do sistema imunológico da pele, entre outros [5-7]. O mecanismo de ação dos filtros UV contidos em produtos comerciais, consiste em bloquear a entrada dos raios UV, por intermédio da formação de uma camada fina à superfície onde é aplicado, protegendo a pele dos humanos, assim como diversos produtos ou materiais, à exposição dos raios UV prejudiciais. Dum modo geral, os filtros UV podem ser de natureza orgânica ou inorgânica, e são usados individualmente ou através da combinação de ambos em produtos cosméticos ou protetores solares, como forma de proteção contra os raios UV-A (400-320 nm), UV-B (320-290 nm) e UV-C (280-100 nm). O modo de ação dos filtros UV de natureza orgânica ou química, baseia-se na absorção dos raios UV através da sua estrutura molecular composta por anéis aromáticos. Por outro lado, os filtros UV de natureza inorgânica ou física, atuam por ação da dispersão e reflexão dos raios UV, processo este que pode repetir-se sucessivamente, no caso de não haver degradação dos mesmos [8-10].

Algumas das principais fontes de contaminação que contêm filtros UV, incluem a libertação de águas residuais industriais, atividades aquáticas, lavagem de roupas, excreção por parte dos humanos, ETAR's, assim como de diversos tipos de embalagens por forma a evitar a degradação dos polímeros constituintes das mesmas [11, 12]. Como consequência, a persistência destas substâncias no ambiente reúne grande preocupação, podendo resultar em efeitos prejudiciais para o ser humano. Atualmente, já há registos da capacidade dos filtros UV de induzirem desregulação endócrina, tendo efeitos ao nível do desenvolvimento e reprodução, nomeadamente os filtros UV do tipo benzofenona, podendo assim ser um risco toxicológico para os humanos e o ambiente em geral [2, 4, 5, 13-17].

Uma vez que em diversas matrizes reais, nomeadamente águas e urina, são detetados níveis baixos de filtros UV, e por forma a controlar os conteúdos em algumas formulações cosméticas, novas metodologias de análise têm sido desenvolvidas e implementadas. Incluídas nestas metodologias, as técnicas de amostragem são usadas previamente às técnicas instrumentais de análise, nomeadamente a sistemas cromatográficos ou hifenados, por forma a isolar e concentrar os analitos. [6, 18-22]. Atualmente, dentro das técnicas de amostragem, os métodos de enriquecimento sortivo são dos mais vulgares para quantificação de níveis baixos de filtros UV em amostras ambientais e biológicas, nomeadamente a SPE [3, 11, 17-19, 21, 23, 24,], a SPME [25-28] e a SBSE [29-34], apesar de algumas destas abordagens recorrerem a processos de derivatização, os quais são indesejáveis experimentalmente e podem introduzir interferências de outro tipo.

Nesta perspetiva, o presente estudo tem como objetivo aplicar e demonstrar a abrangência da BA μ E, como alternativa a outras técnicas de microextração sortiva para enriquecimento analítico, prévios à análise por HPLC-DAD, para a análise de filtros UV de tipo benzofenona (benzofenona (BPF), 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona (HMB), 2,4-hidroxibenzofenona (DHB) e 4-hidroxi-benzofenona (HBP)) em matrizes reais, cujas estruturas se encontram reproduzidas na figura 6.1. Para o efeito, foram efetuados ensaios de otimização, que consistiram na comparação de sorventes e interações químicas, bem como no estudo de parâmetros experimentais, nomeadamente o desenvolvimento,

validação e aplicação da metodologia proposta em águas de diverso tipo, produtos cosméticos e urina.

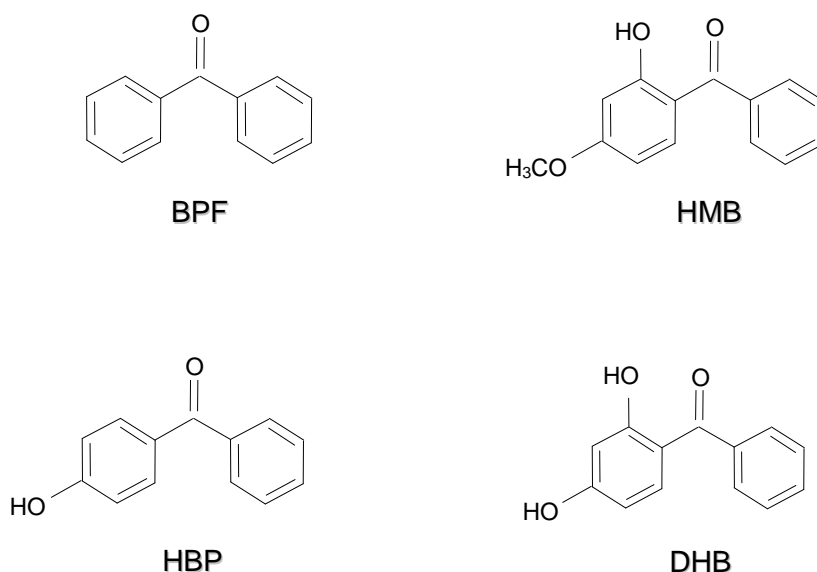


Figura 6.1 - Estruturas químicas das quatro benzofenonas selecionados para o presente estudo.

6.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1. Condições de operação instrumental

No presente estudo, quatro filtros UV de tipo das benzofenonas (HBP, DHB, BPF e HMB) foram selecionados como compostos modelo (figura 6.1). Por forma a avaliar as condições instrumentais do sistema de HPLC-DAD, o primeiro passo consistiu na injeção de padrões individuais e misturas, para determinar o tempo de retenção, resolução e espectro de absorção UV/vis. De acordo com os dados obtidos, os comprimentos de onda selecionados foram de 250 e 290 nm, uma vez que correspondem ao máximo de absorção dos compostos em estudo [23]. A fase móvel constituída por MeOH (75 %) e H₂O (25 %) e, usando uma coluna convencional de fase reversa (25 °C), permitiu obter boa resposta para os filtros UV em estudo, e resolução em tempo analítico adequado (< 10 min).

Posteriormente, a sensibilidade instrumental foi determinada por intermédio dos LODs e LOQs, através da injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos e calculados através de S/N igual a 3 e 10, respetivamente.

Neste sentido, obtiveram-se valores de 10,0 µg/L para os LODs e 33,0 µg/L para os LOQs, para os quatro filtros UV em estudo. De seguida, foi efetuada a calibração instrumental com recurso à injeção de padrões de calibração contendo os quatro filtros UV, abrangendo concentrações compreendidas entre 40 e 2000 µg/L, constituídas por doze níveis. Nesta gama, obtiveram-se boas linearidades para as quatro benzofenonas, com coeficientes de determinação superiores a 0,9983 (HMB). A precisão instrumental foi igualmente avaliada com recurso a injeções repetidas de padrões, e que mostrou valores inferiores a 8,2 % (BPF), expressos em RSD. Na tabela 6.1, estão presentes os dados instrumentais otimizados por HPLC-DAD. A injeção somente de solvente, mostrou a não existência de efeitos de memória.

Tabela 6.1 - Log K_{OW} , pK_a , tempo de retenção (t_R), comprimento de onda ($\lambda_{m\acute{a}x}$) e coeficientes de determinação para as quatro benzofenonas em estudo obtidos por HPLC-DAD, sob condições instrumentais otimizadas.

| Filtros UV | log K_{OW} ^a | pK_a ^b | t_R (min) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) | r^2 ^d |
|------------|---------------------------|---------------------|----------------|---------------------------------|--------------------|
| HBP | 2,67 | 8,12 | 2,1 | 290 | 0,9989 |
| DHB | 2,96 | 7,78/11,74 | 3,9 | 290 | 0,9986 |
| BPF | 3,15 | - ^c | 4,1 | 250 | 0,9989 |
| HMB | 3,52 | 10,17 | 8,2 | 290 | 0,9983 |

^a US EPA (2011) Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v. 4.1.1. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC;

^b [35];

^c Não ionizável;

^d Doze níveis de concentração desde 40,0 a 2000,0 µg/L.

6.2.2. Seleção das fases de revestimento para a BAµE

Para o presente estudo, foram selecionadas fases sorventes com características distintas para serem testadas como revestimento na BAµE, de acordo com estudos prévios [36-38]. Assim, foram testados três Ps (P1, P2 e P3) e cinco ACs (AC1, AC2, AC3, AC4 e AC5), para a microextração dos filtros UV em estudo. As propriedades químicas dos filtros UV, nomeadamente o pK_a e o log K_{OW} , encontram-se presentes na tabela 6.1, as quais podem ter grande

influência nos mecanismos de interação com as fases sorventes selecionadas durante o processo de microextração.

6.2.2.1. Caracterização dos materiais sorventes

Os polímeros selecionados para o presente estudo, são constituídos por PS-DVB (P1), pirrolidona modificada (P2) e ciano (P3), com tamanhos de partícula $\leq 100 \mu\text{m}$, tamanhos de poro $\leq 260 \text{ \AA}$ e áreas superficiais compreendidas entre 500 e 800 m^2/g , apresentando grande estabilidade à variação de pH (1-14).

Por outro lado, entre os ACs selecionados, estes possuem áreas superficiais compreendidas entre 900 a 1500 m^2/g . Uma vez as características superficiais dos ACs poderem ser determinantes no processo de microextração, determinou-se o pH_{PZC} para cada AC [39-41]. Dos dados experimentais obtidos, os pH_{PZC} estimados foram de 8,5 para AC1, 7,5 para AC2, 8,4 para AC3, 6,4 para AC4 e 2,2 para AC5. Assim, conhecendo os valores de pH_{PZC} , podemos afirmar que AC1 e AC3 são materiais com características básicas, AC2 e AC4 apresentam características aproximadamente neutras, e AC5 tem características ácidas.

Entre os quatro filtros UV em estudo, pode dizer-se que apresentam características de ácidos fracos [21, 22, 42] e polaridade intermédia ($2,67 < \log K_{\text{OW}} < 3,52$), sendo que estas propriedades podem ser decisivas nos mecanismos de interação envolvidos com as fases sorventes a testar durante os ensaios de microextração.

6.2.2.2. Seletividade dos materiais sorventes

Para se estudar a seletividade dos materiais sorventes selecionados, foram efetuados ensaios em água ultrapura, sob condições experimentais padrão (extração - 25 mL (8,0 $\mu\text{g/L}$), 1000 rpm, 2 e 16 h, pH 5,5; retroextração - 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassónico), de acordo com trabalhos anteriores [38]. A figura 6.2.a mostra as recuperações obtidas

para os materiais poliméricos testados, onde se verifica que são obtidas melhores eficiências para P1 e P2, nomeadamente na extração durante 16 horas dos quatro filtros UV em estudo. A figura 6.2.b mostra que entre os ACs testados, AC4 e AC5 apresentaram melhor eficiência do que os restantes, com boas recuperações para 16 horas de equilíbrio, sob condições experimentais padrão idênticas.

Dos resultados obtidos, as fases sorventes constituídas por PS-DVB (P1) e pirrolidona modificada (P2) apresentam mecanismos de interação mais fortes do que o ciano (P3) para as quatro benzofenonas, enquanto para os ACs, o AC4 e AC5 apresentam melhor eficiência e, igualmente, interações mais fortes. Entre as fases poliméricas testadas, para além das propriedades físicas, a retenção dos analitos ocorre de acordo com mecanismos de interação múltiplos, nomeadamente de tipo π - π , dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio e interações iónicas [37, 38]. Assim, os mecanismos de interação entre as quatro benzofenonas, P1 e P2 parecem ser influenciados predominantemente por interações π - π e/ou ligações de hidrogénio, devido aos anéis aromáticos presentes nos sorventes e nos filtros UV. Enquanto a eficiência analítica dos polímeros depende principalmente da polaridade das benzofenonas em estudo, as interações químicas dos ACs (AC1-AC5) com as mesmas, aparentam ser influenciadas pelos pH_{PZC} dos ACs. No caso dos ACs, as interações electroestáticas e/ou dispersivas são decididamente influenciadas pelo pH_{PZC} , sendo que as propriedades texturais não aparentam ser decisivas no processo de microextração. No caso particular de AC4 e AC5, possuindo as melhores eficiências entre todos os ACs, as interações destes com as quatro benzofenonas são influenciadas pelo pH_{PZC} , onde as características ácidas apresentam vantagens durante a microextração. Assim, para uma determinada matriz na qual o pH é igual ao pH_{PZC} , a superfície do AC terá carga neutra, devido ao mesmo número de cargas positivas e negativas. No caso do pH da amostra ser inferior ao pH_{PZC} , a carga superficial será positiva, e negativa se o pH da amostra for superior ao pH_{PZC} [40, 41, 43]. Deste modo, e uma vez que AC4 mostrou melhor eficiência a pH 5,5, a carga superficial do mesmo é balanceada entre neutra e positiva, enquanto as benzofenonas se encontram na

forma molecular neutra [35], sendo o processo de microextração favorecido por este facto.

Neste sentido, o polímero P2 e o carvão AC4 foram seleccionadas e usadas para estudos posteriores, nomeadamente desenvolvimento, otimização, validação e aplicação em matrizes reais com recurso a BAμE, uma vez terem demonstrado melhor eficiência na microextração das quatro benzofenonas.

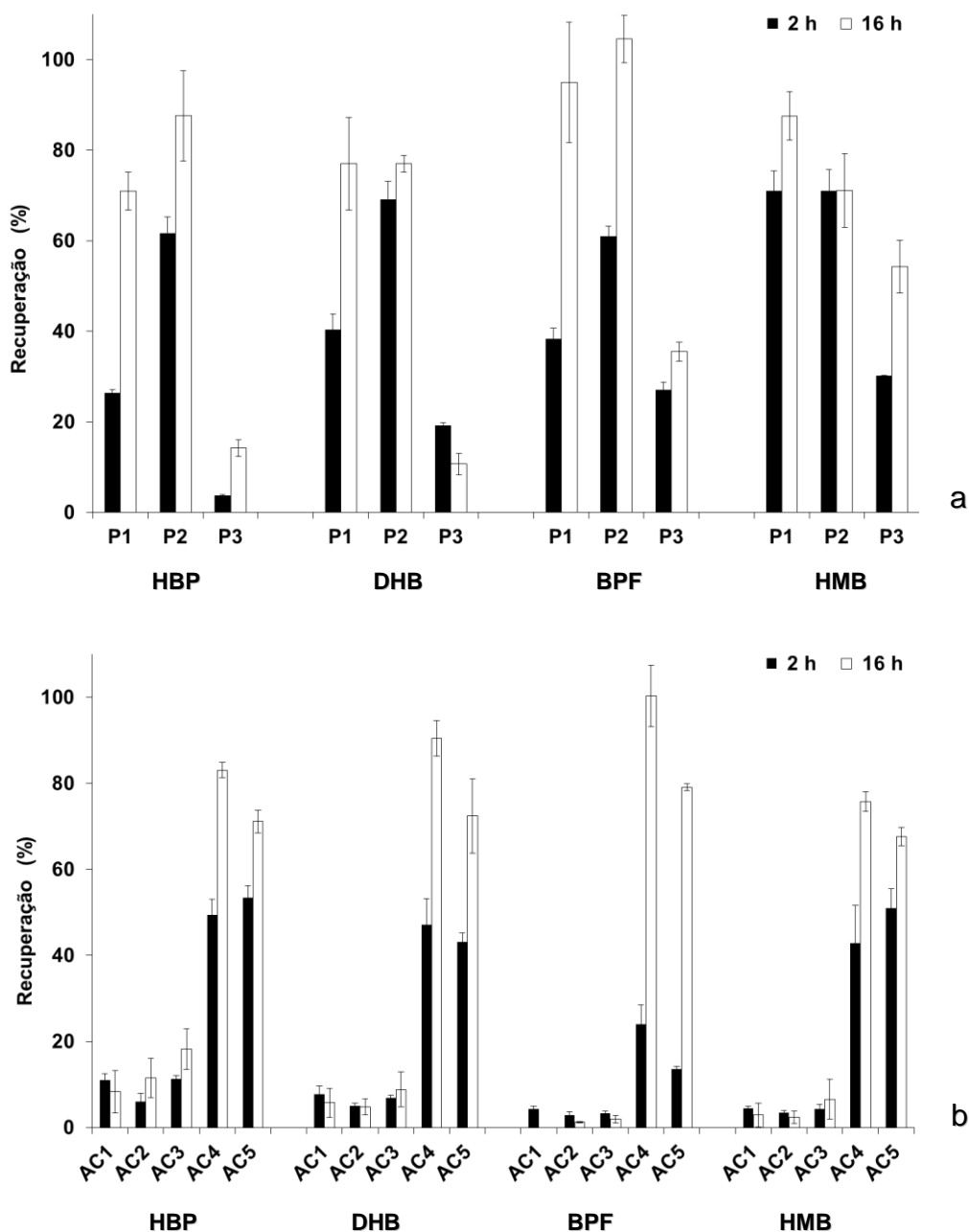


Figura 6.2 - Recuperação média obtida com diferentes Ps (a) e ACs (b) para os quatro filtros UV em água ultrapura por BAμE-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, em condições experimentais padrão. Condições - extração: 25 mL (8,0 µg/L), 1000 rpm, 2 e 16 h, pH 5,5; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassónico.

6.2.3. Otimização da eficiência da BAμE(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)

Após terminada a seleção das fases sorventes mais eficientes, para a implementação de qualquer metodologia analítica foi necessária a otimização de vários parâmetros que podem afetar a eficiência dos analitos em estudo por forma a alcançar o máximo desempenho possível. Assim, foram realizados ensaios sistemáticos em água ultrapura fortificada (8,0 µg/L) com as quatro benzofenonas, com o objetivo de otimizar os parâmetros experimentais que podem influenciar de modo decisivo a eficiência da BAμE(P2 e AC4)-LD, nomeadamente o tempo de extração, agitação, pH, força iónica e polaridade da matriz, assim como o tipo de solvente e tempo de retroextração, de acordo com trabalhos anteriores [36-38, 43-47].

6.2.3.1. Estudo dos parâmetros da LD(1,5 mL)

A primeira etapa, foi averiguar se no passo de evaporação havia perdas de filtros UV, uma vez que pode ser um passo limitativo durante a troca de solvente, levando à diminuição da sensibilidade. Deste modo, foram preparadas em triplicado misturas das quatro benzofenonas para níveis de 1,0 e 0,5 mg/L, evaporados à secura através de fluxo suave de azoto gasoso, e posteriormente dissolvidos em 200 µL de MeOH, seguida de análise por HPLC-DAD. Dos dados obtidos e por comparação com os padrões controlo, foram observadas perdas negligenciáveis, com recuperações que oscilaram entre 95,9 % (BPF) e 101,8 % (DHB), para os quais a precisão foi inferior a 4,2 % (HBP). Assim, o passo de evaporação não revelou ser um passo limitativo para a análise das benzofenonas através da metodologia proposta.

De seguida, prosseguiu-se para a avaliação do solvente que garante a retroextração completa da fase sorvente. Este passo é muito importante, uma vez que o solvente deve ser cuidadosamente selecionado, de modo a possuir força suficiente para promover a remoção do material sorvente, sendo auxiliada por ação ultrassónica [36-38]. Assim, os solventes ACN, MeOH, mistura de ACN/MeOH (1:1, v/v) com características polares, e *n*-C5 com características

apolares, foram testados no sentido de se averiguar qual seria o melhor solvente. A figura 6.3.a mostra o perfil obtido para os solventes testados, onde é notório o melhor desempenho dos solventes polares. Apesar de se obterem resultados semelhantes entre os solventes polares, a mistura de ACN/MeOH (1:1, v/v) foi selecionada para estudos posteriores, uma vez que demonstrou melhor desempenho.

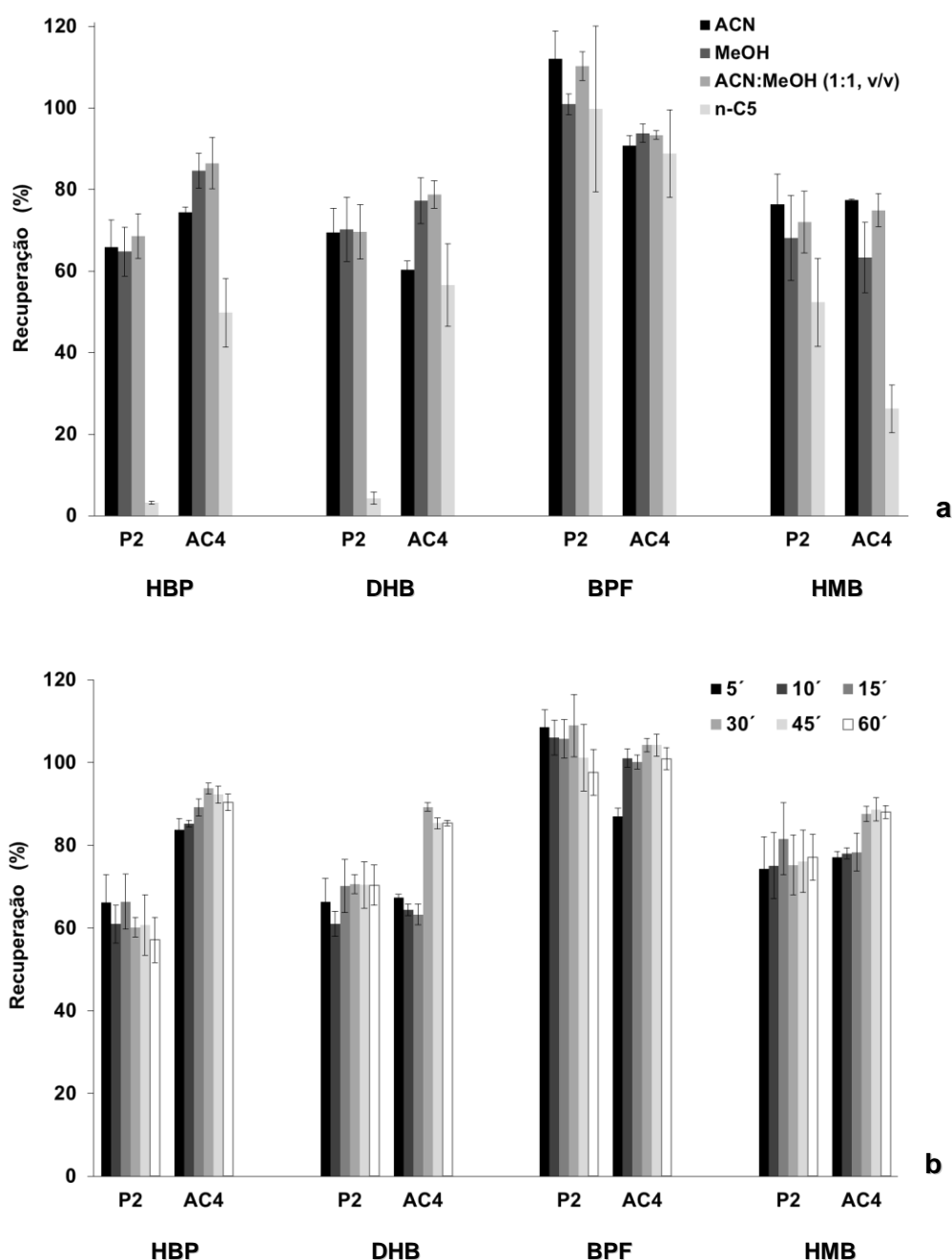


Figura 6.3 - Efeito do solvente (a) e do tempo no ultrassons (b) na retroextração da BAμE(P2 e AC4). Condições - (a) extração: 25 mL (8,0 µg/L), 2 h (P2) e 16 h (AC4), 1000 rpm, pH 5,5; LD: 1,5 mL, 30 min de tratamento ultrassônico; (b) extração: 25 mL (8,0 µg/L), 2 h (P2) e 16 h (AC4), 1000 rpm, pH 5,5; LD: 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v).

De seguida, foi estudado o tempo de ultrassons necessário na retroextração, com tempos de 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min. Dos dados obtidos, apesar de se observarem pequenas diferenças entre os tempos testados para o P2 e AC4, foram obtidas boas recuperações, tendo sido selecionado para estudos posteriores o tempo de 15 min para o P2 e 30 min para o AC4. No sentido de se averiguar possíveis retenções na BA μ E(P2 e AC4) e/ou efeitos de memória ou *carryover*, foram efetuadas retroextrações consecutivas das mesmas barras de microextração e injetadas no sistema de HPLC-DAD. Dos resultados obtidos após a retroextração usando ACN/MeOH (1:1, v/v) sob tratamento ultrassónico por 15 (P2) e 30 (AC4) minutos, verificou-se que o ruído existente foi sempre inferior aos LODs instrumentais.

6.2.3.2. Estudo dos parâmetros da BA μ E(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)

Uma vez o processo de microextração ser baseado no equilíbrio entre os analitos, a fase sorvente e a matriz aquosa, vários parâmetros têm que ser estudados e otimizados, por forma a controlar todo o processo. Assim, entre estes parâmetros, o tempo de extração e velocidade de agitação possuem um papel fundamental, controlando a velocidade de transferência de massa entre as fases envolvidas, podendo limitar a eficiência do processo [36-38, 43-46]. Desta forma, o equilíbrio de extração foi avaliado com tempos compreendidos entre 1 e 16 h para as quatro benzofenonas em estudo. A figura 6.4.a mostra o perfil obtido para o tempo de extração, onde para o P2 são necessárias 4 horas para se atingir máxima eficiência, enquanto para AC4 são necessárias 16 horas para se alcançar recuperações mais elevadas. Neste sentido, foram selecionados os tempos de 4 e 16 horas para os sorventes P2 e AC4, respetivamente.

A velocidade de agitação foi o parâmetro a ser estudado de seguida, o qual é importante durante o processo de enriquecimento, uma vez que pode afetar a transferência de massa dos analitos alvo para a fase sorvente [37, 38, 48]. Dependendo do tamanho das barras de agitação magnética, velocidades elevadas (> 1000 rpm) são normalmente evitadas, uma vez que ao gerar turbulência perturba o dispositivo de microextração que se encontra abaixo do *vortex*, podendo originar eficiência e precisão reduzidas [49-51]. Deste modo,

dos ensaios realizados a 750, 1000 e 1250 rpm, à temperatura ambiente, não houve diferenças significativas para ambos os sorventes (dados não apresentados), sendo que 1000 rpm foram selecionadas para estudos posteriores.

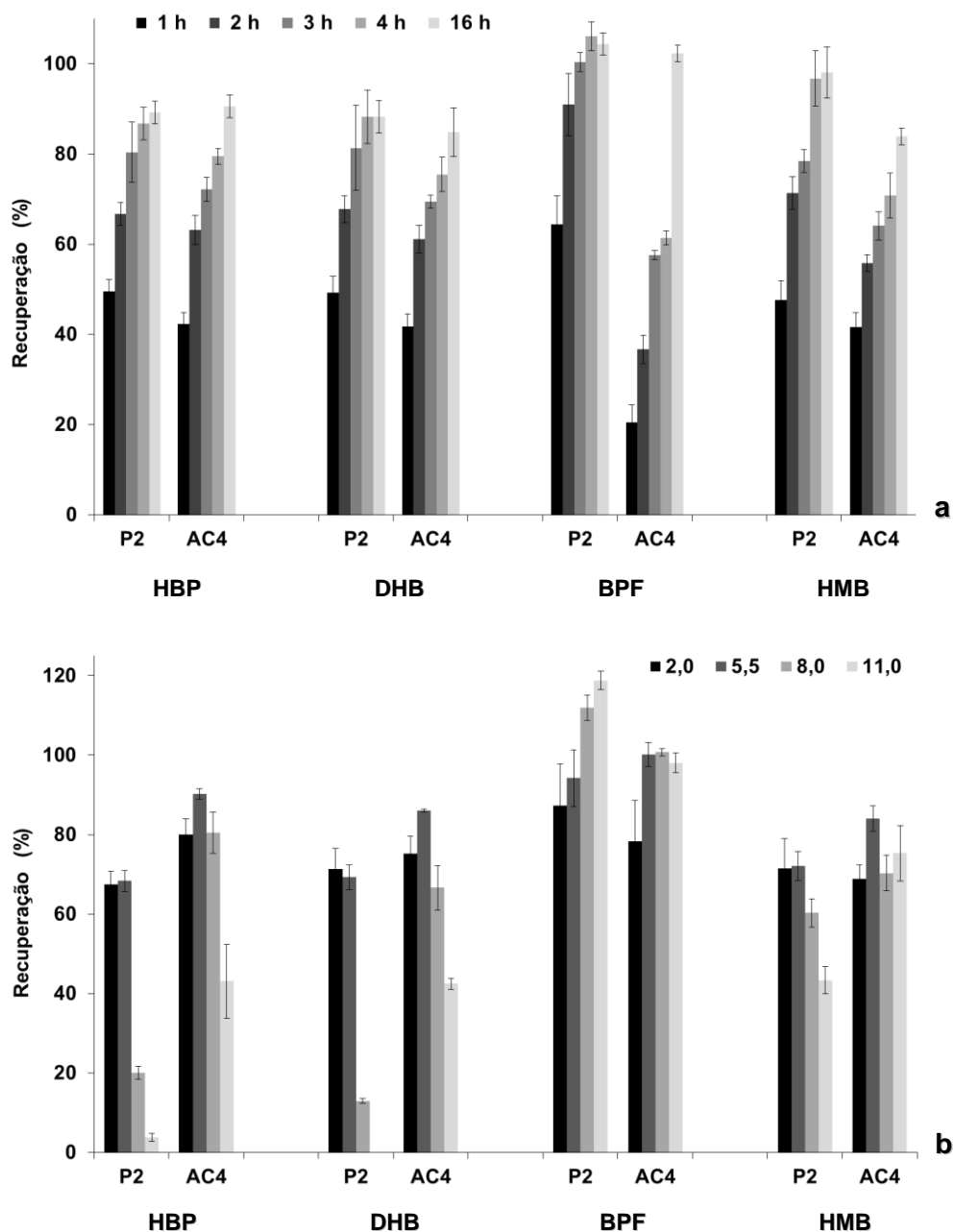


Figura 6.4 - Efeito do tempo de extração (a) e pH (b) na eficiência da BAμE(P2 e AC4). Condições - (a) extração: 25 mL (8,0 μg/L), 1000 rpm, pH 5,5; LD: 1,5 mL ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 (P2) e 30 (AC4) min de tratamento ultrassônico; (b) extração: 25 mL (8,0 μg/L), 1000 rpm, 2 h (P2) e 16 h (AC4), pH 5,5; LD: 1,5 mL ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 (P2) e 30 (AC4) min de tratamento ultrassônico.

As características da matriz têm enorme importância, nomeadamente no que diz respeito ao pH, força iónica e polaridade, e como tal foram igualmente estudadas. Uma vez o pH ter grande influência no processo de enriquecimento, foram testados vários valores, nomeadamente 2,0, 5,5, 8,0 e 11,0, para averiguar o efeito na eficiência das quatro benzofenonas na microextração por BAμE(P2 e AC4). O efeito do pH é de extrema importância, uma vez que determina o estado de dissociação dos analitos, assim como a afinidade dos mesmos para os materiais sorventes. A figura 6.4.b, mostra o perfil de dados obtidos para o efeito de pH, onde é evidente a influência do pH na eficiência de extração para ambos os sorventes, influenciando a dissociação das benzofenonas e as interações com os sorventes. No caso das quatro benzofenonas, estas possuem características ácidas, exceto a BPF que apresenta uma estrutura estável não sofrendo por isso qualquer ionização, enquanto a HBP, DHB e HMB, ionizam a partir de pHs superiores a 5,6, 6 e 8, respetivamente [35]. Deste modo, para pHs inferiores e compreendidos entre 5,6 e 6,0, a forma molecular das benzofenonas em estudo é, em geral, predominantemente neutro. Uma vez que a fase P2 possui grande estabilidade ao pH, P2 não é afetada mantendo a sua estrutura original. Deste modo, pelos dados obtidos pode afirmar-se que para pH 2,0 e 5,5, a forma neutra das benzofenonas é predominante, e que, para pH 8,0 e 11,0 a forma aniónica (desprotonada) das benzofenonas (à exceção da BPF) é predominante, ocorrendo por isso forte diminuição da recuperação, especialmente para o HBP e DHB. No caso do HMB, uma vez que só para pH superior a 8,0 sofre ionização com formação da forma aniónica, explica a razão de só a pH 11,0 sofrer substancial redução da eficiência [26]. Para o caso dos ensaios realizados por BAμE(AC4), os resultados obtidos são um pouco diferentes, uma vez que a superfície do AC4 é facilmente afetada pela variação do pH da matriz. Considerando que AC4 possui um pH_{PZC} de 6,4, quando o pH da matriz for superior, a superfície de AC4 terá carga negativa. No caso da HBP e DHB, a redução da eficiência ocorre principalmente a pH 11,0, o que pode acontecer devido ao facto da forma aniónica dos dois analitos ser abundante e o AC4 possuir carga negativa, havendo repulsão entre as partes envolvidas. No entanto, para os pHs testados a 2,0 e 5,5, apesar de AC4 possuir carga superficial positiva e as benzofenonas (à exceção da BPF) a forma molecular

neutra, são observadas variações negligenciáveis. Todavia, para pH 11,0, apesar de AC4 estar carregado negativamente e o HMB estar maioritariamente na forma aniônica, não é observada redução da eficiência. Assim, ficou demonstrado que é necessário o controle do pH da matriz, por forma a facilitar a migração dos analitos para a fase polimérica e aumentar a eficiência da microextração. Deste modo, o pH 5,5 foi selecionado para estudos posteriores.

A força iônica foi estudada posteriormente, o qual pode afetar a eficiência da microextração (*salting-out*). Através da adição dum eletrólito, a solubilidade de compostos orgânicos é reduzida, favorecendo a migração dos mesmos para a fase sorvente, em particular para compostos polares e semi-polares ($2,5 < \log K_{OW} < 3,5$), sendo o caso das benzofenonas em estudo [37]. Os ensaios realizados por adição de 5, 10 e 15 % (p/v) em NaCl, mostraram que as variações são pequenas ou negligenciáveis (dados não apresentados) na microextração das benzofenonas para P2 e AC4.

A modificação da polaridade através da adição de MeOH, é importante por forma a avaliar a ocorrência do *wall-effect* das benzofenonas menos polares, aumentando assim a solubilidade das mesmas em solução. O perfil obtido dos ensaios realizados através da adição de 5, 10 e 15 % (v/v) (dados não apresentados), mostra que a extração da fase P2 não é afetada pela adição dum modificador orgânico. No entanto, AC4 mostra ligeira redução da eficiência com a adição de MeOH para HBP, DHB e HMB, enquanto a BPF não sofre qualquer alteração. Como consequência, para o desenvolvimento da metodologia proposta, não é necessária a adição de eletrólito e modificador orgânico.

6.2.4. Validação da metodologia BA μ E(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD

Depois de finalizada a otimização, tendo-se alcançado as melhores condições de microextração da BA μ E(P2 e AC4)-LD, prosseguiu-se para a validação da metodologia, usando as seguintes condições otimizadas, dependendo do sorvente a usar: extração - 25 mL, 1000 rpm, 4 h (P2) e 16 h (AC4), pH 5,5; LD - 1,5 mL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 15 (P2) e 30 (AC4) min de

tratamento ultrassônico. Dos ensaios realizados em 25 mL de água ultrapura fortificada (8,0 µg/L) nas condições experimentais otimizadas, obtiveram-se eficiências superiores a 91,1 % para BAµE(P2, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD e 76,6 % para BAµE(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, com precisões inferiores a 6,4 % e 8,3 %, respetivamente. Relativamente à sensibilidade, foi averiguada através da determinação dos limiares analíticos, com LODs a variarem entre 0,3 e 0,5 µg/L, e LOQs entre 1,0 e 1,6 µg/L. Dos resultados adquiridos da calibração do método realizados em 25 mL de água ultrapura, obteve-se boa linearidade com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9969, numa gama de concentrações compreendida entre 1,0 e 24,0 µg/L, tendo-se verificado precisões inferiores a 10,5 % (HMB, 8,0 µg/L) por BAµE(P2, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD e 13,4 % (HMB, 20,0 µg/L) por BAµE(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD. A tabela 6.2 resume todos os dados obtidos da validação, relativamente à calibração, sensibilidade e eficiência sob condições experimentais otimizadas, para ambos os métodos propostos neste estudo.

Tabela 6.2 - Recuperação média, LODs, LOQs e coeficientes de determinação obtidos para os filtros UV em estudo, através do método BAµE(P2 e AC4)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

| Filtros UV | Recuperação ^a (% ± RSD) | | LODs (µg/L) | | LOQs (µg/L) | | r^2 | |
|------------|---------------------------------------|------------|----------------|-----|----------------|-----|-----------------|------------------|
| | P2 | AC4 | P2 | AC4 | P2 | AC4 | P2 ^b | AC4 ^c |
| HBP | 91,1 ± 2,1 | 90,1 ± 5,7 | 0,3 | 0,4 | 1,0 | 1,3 | 0,9970 | 0,9981 |
| DHB | 93,1 ± 3,6 | 83,2 ± 3,3 | 0,3 | 0,4 | 1,0 | 1,3 | 0,9973 | 0,9973 |
| BPF | 103,5 ± 6,4 | 98,3 ± 4,3 | 0,5 | 0,5 | 1,6 | 1,6 | 0,9987 | 0,9969 |
| HMB | 98,4 ± 1,7 | 76,6 ± 8,3 | 0,3 | 0,4 | 1,0 | 1,3 | 0,9975 | 0,9978 |

^a Ensaios a 8,0 µg/L; n = 3;

^b Onze níveis de concentração desde 1,0 a 24,0 µg/L;

^c Doze níveis de concentração desde 2,0 a 24,0 µg/L.

As metodologias propostas foram igualmente avaliadas no que diz respeito à repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes. Para o efeito, foram realizados em triplicado ensaios em água ultrapura para os níveis de 2,0, 14,0 e 24,0 µg/L no mesmo dia, e para níveis de 8,0, 12,0 e 16,0 µg/L em três dias diferentes. A tabela 6.3 resume todos os dados obtidos para os ensaios de

repetibilidade expressos em RSD, tendo sido alcançados bons resultados. Para os estudos de repetibilidade efetuados no mesmo dia, os RSD são inferiores a 10,2 % (14,0 µg/L) para BAµE(P2, 2,5 mg)-LD(1,5 mL) e 13,0 % (24,0 µg/L) para BAµE(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL). No que respeita à repetibilidade em dias diferentes, os RSD são inferiores a 8,7 % (16,0 µg/L) para BAµE(P2, 2,5 mg)-LD(1,5 mL) e 8,9 % (16,0 µg/L) para BAµE(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL).

Tabela 6.3 - Ensaios de repetibilidade expressos em recuperação média e precisão respetiva expressa em RSD, obtidos pelos métodos BAµE(P2, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD e BAµE(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, para as quatro benzofenonas em estudo sob condições experimentais otimizadas.

| Filtros UV | Repetibilidade ^a | | | | | |
|------------|--|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | 2,0 µg/L | | 14,0 µg/L | | 24,0 µg/L | |
| | Recuperação (% ± RSD) | | | | | |
| | P2 | AC4 | P2 | AC4 | P2 | AC4 |
| | HBP | 87,8 ± 5,6 | 88,2 ± 3,4 | 87,7 ± 5,1 | 89,1 ± 3,0 | 86,6 ± 3,0 |
| DHB | 89,8 ± 5,0 | 83,9 ± 1,5 | 89,3 ± 8,3 | 88,7 ± 6,3 | 91,2 ± 6,5 | 84,6 ± 12,7 |
| BPF | 99,4 ± 8,3 | 105,7 ± 6,7 | 100,3 ± 10,2 | 94,7 ± 11,1 | 102,8 ± 0,5 | 92,3 ± 7,1 |
| HMB | 102,7 ± 2,6 | 82,8 ± 8,5 | 94,9 ± 5,5 | 82,1 ± 9,0 | 94,9 ± 4,0 | 78,5 ± 13,0 |
| Filtros UV | Repetibilidade em dias diferentes ^b | | | | | |
| | 8,0 µg/L | | 12,0 µg/L | | 16,0 µg/L | |
| | Recuperação (% ± RSD) | | | | | |
| | P2 | AC4 | P2 | AC4 | P2 | AC4 |
| | HBP | 93,4 ± 8,2 | 95,1 ± 5,4 | 90,7 ± 4,0 | 95,2 ± 4,0 | 90,1 ± 3,5 |
| DHB | 95,0 ± 5,5 | 90,7 ± 3,1 | 93,0 ± 4,9 | 93,8 ± 5,7 | 95,8 ± 4,8 | 90,1 ± 8,1 |
| BPF | 98,7 ± 3,4 | 100,7 ± 8,6 | 102,1 ± 4,8 | 102,7 ± 7,1 | 99,1 ± 6,2 | 91,2 ± 8,7 |
| HMB | 94,7 ± 7,7 | 92,1 ± 6,3 | 93,1 ± 7,1 | 92,5 ± 4,6 | 93,1 ± 8,7 | 82,7 ± 8,9 |

^a n = 3;

^b Três dias consecutivos (n = 9).

A figura 6.5 mostra um cromatograma obtido dum ensaio de recuperação em água ultrapura fortificada (8,0 µg/L) por BAµE(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas, onde é possível observar bom desempenho analítico.

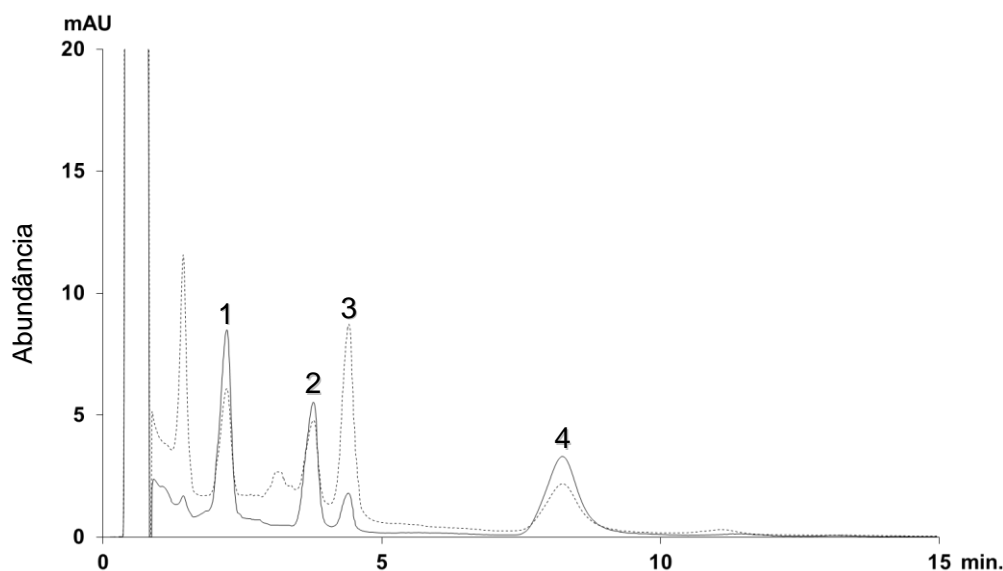


Figura 6.5 - Cromatograma resultante de um ensaio de recuperação (8,0 µg/L) obtido por BAµE(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-HBP, 2-DHB, 3-BPF, 4-HMB.

Embora ambas as metodologias propostas neste estudo apresentem eficiências superiores e não necessitem de derivatização quando comparada com outros métodos sortivos estáticos (SBSE(PDMS)) [29, 33, 34], a sensibilidade analítica das metodologias desenvolvidas neste estudo poderão ser consideravelmente melhoradas acoplando HPLC à espectrometria de massa (LC-MS ou LC-MS/MS). Os sistemas hifenados podem, neste sentido, melhorar a sensibilidade analítica, reduzindo os LODs e permitindo a identificação inequívoca de analitos desconhecidos, especialmente na presença de matrizes complexas, usando ou não processos de derivatização [30, 32-34].

6.2.5. Aplicação das metodologias BA μ E(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD a matrizes reais

A aplicação a matrizes reais, é um passo decisivo de forma a demonstrar a capacidade analítica das metodologias BA μ E(P2, 2,5 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD e BA μ E(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD. Neste sentido, estas metodologias foram aplicadas a amostras de água do mar, água residual, cosméticos e urina. Uma vez as matrizes reais apresentarem complexidade elevada, recorreu-se ao SAM para minimizar eventuais efeitos de matriz, sendo a melhor estratégia analítica para amostras reais [37].

Assim, as matrizes de água de mar, residuais e cosméticos foram fortificadas para níveis de concentração compreendidos entre 4,0 e 16,0 $\mu\text{g/L}$, enquanto as amostras de urina desde 8,0 a 24,0 $\mu\text{g/L}$, tendo sido incluído o ensaio em branco (C_0), que corresponde à amostra sem qualquer adição de padrão. A tabela 6.4 resume os resultados obtidos pelo SAM nas matrizes reais estudadas, sob condições experimentais otimizadas.

Dos resultados obtidos, observa-se boa linearidade ($r^2 > 0,9951$), tendo sido detetados algumas das benzofenonas em estudo, com boa concordância entre os sorventes estudados. Nas amostras de água de mar e urina, não foram detetados quaisquer filtros UV em estudo ($< \text{LODs}$). No caso da amostra de água residual, foi detetado a BPF com pequena diferença no desempenho entre os sorventes P2 e AC4. Relativamente às amostras de cosméticos, é usual as formulações conterem filtros UV, nomeadamente de tipo benzofenona. Neste sentido, foram detetados níveis semelhantes de DHB no *aftershave*, tendo no protetor solar sido detetado HMB com ligeira diferença entre os sorventes P2 e AC4, que se pode ficar a dever à melhor seletividade do primeiro, sendo menos suscetível a interferências analíticas por parte da amostra em estudo.

Tabela 6.4 - Coeficientes de determinação e concentrações médias detetadas de filtros UV, obtidos através do SAM nas matrizes reais estudadas, pelos métodos BAμE(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

| | Água de mar | | Água residual | | Aftershave | | Protetor solar | | Urina | |
|---------------------------------|-------------------------|--------|---------------|---------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------|--------|
| | P2 | AC4 | P2 | AC4 | P2 | AC4 | P2 | AC4 | P2 | AC4 |
| Filtros UV | r^2 | | | | | | | | | |
| HBP | 0,9992 | 0,9985 | 0,9956 | 0,9990 | 0,9987 | 0,9981 | 0,9984 | 0,9992 | 0,9982 | 0,9951 |
| DHB | 0,9995 | 0,9993 | 0,9989 | 0,9988 | 0,9969 | 0,9955 | 0,9992 | 0,9981 | 0,9990 | 0,9978 |
| BPF | 0,9978 | 0,9978 | 0,9958 | 0,9976 | 0,9976 | 0,9994 | 0,9994 | 0,9952 | 0,9967 | 0,9988 |
| HMB | 0,9994 | 0,9993 | 0,9979 | 0,9992 | 0,9987 | 0,9968 | 0,9988 | 0,9969 | 0,9999 | 0,9977 |
| Concentração (μg/L ± DP) | | | | | | | | | | |
| HBP | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| DHB | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | 1,6±0,1 ^a | 1,5±0,1 ^a | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| BPF | <LOD | <LOD | 2,2±0,4 | 2,5±0,3 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| HMB | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD | 68,4±4,4 ^b | 60,5±5,3 ^b | <LOD | <LOD |

^a g/L;
^b mg/g.

A figura 6.6 mostra os cromatogramas referentes aos ensaios efetuados nas amostras de *aftershave* (a) e protetor solar (b), por BAμE(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

Os níveis detetados no *aftershave* estão compreendidos no intervalo de 0,1-0,2 % de DHB na amostra, enquanto no protetor solar os níveis detetados em HMB correspondem a 6,8 % por BAμE(P2, 2,5 mg)-LD(1,5 mL) e 6,1 % por BAμE(AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL). Refira-se que todos os níveis detetados, se encontram abaixo do limite máximo admissível permitido pela EU (JO da EU, no. 1223/2009, L342/59), que estabelece um máximo de 10 % destas substâncias em produtos cosméticos.

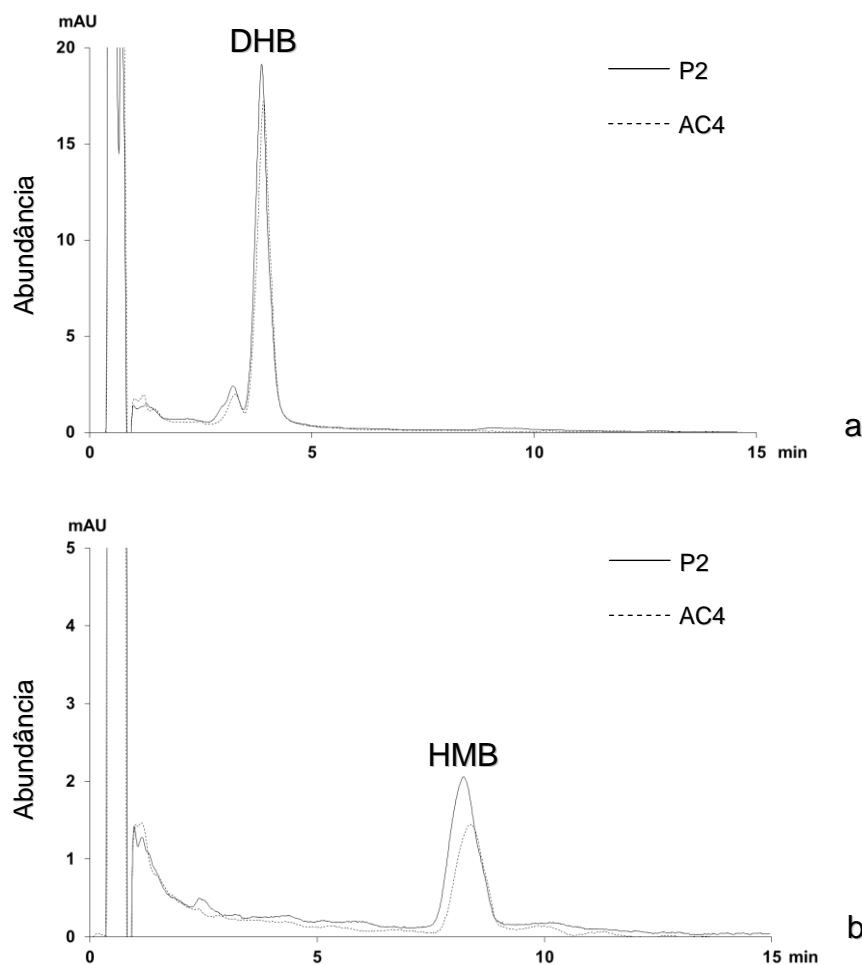


Figura 6.6 - Cromatogramas resultante dos ensaios em *aftershave* (a) e protetor solar (b), obtido por BA μ E-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas.

6.3. CONCLUSÕES

A metodologia proposta (BA μ E-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD) no presente estudo, usando um sorvente polimérico (P2) e um carvão ativado (AC4), foi desenvolvida, otimizada e validada para a monitorização simultânea de quatro filtros UV em matrizes reais. Sob condições experimentais otimizadas, demonstrou excelente desempenho analítico, nomeadamente boa eficiência, precisão adequada, limiares analíticos ao nível dos ppb's e boa gama linear dinâmica. A aplicação da metodologia a matrizes reais de águas, produtos cosméticos e urina, demonstrou excelente desempenho analítico com recurso ao SAM.

Em resumo, as novas abordagens analíticas propostas, BA μ E(P2, 2,5 mg; AC4, 1,8 mg)-LD(1,5 mL)/HPLC-DAD, que operam sob tecnologia de amostragem por flutuação, demonstraram ser de fácil execução e implementação experimental, eficiente, seletiva e sensível, apresentando-se como alternativa para a análise de filtros UV do tipo benzofenonas em matrizes reais, e com a possibilidade de selecionar a fase sorvente mais adequada aos analitos em estudo.

6.4. REFERÊNCIAS

1. Almeida, C.; Stępkowska, A.; Alegre, A.; Nogueira, J. M. F.; Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A*, 1311 (2013) 1-10.
2. Kunz, P. Y.; Galicia, H. F.; Fent, K.; Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicology Science* 90(2) (2006) 349-361.
3. Silva, C. P.; Emídio, E. S.; Marchi, M. R. R.; UV Filters in Water Samples: Experimental Design on the SPE Optimization followed by GC-MS/MS Analysis. *Journal of the Brazilian Chemistry Society* vol 24/nº 9 (2013) 1433-1441.
4. Wu, J.-W.; Chen, H.-C.; Ding, W.-H.; Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction plus simultaneous silylation for rapid determination of salicylate and benzophenone-type ultraviolet filters in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1302 (2013) 20-27.
5. Krause, M.; Klit, A.; Jensen, M. B.; Sørensen, T.; Frederiksen, H.; Schlumpf, M.; Lichtensteiger, W.; Skakkebaek, N. E.; Drzewiecki, K. T.; Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *International Journal of Andrology* 35 (2012) 424-436.
6. Chisvert, A.; Tarazona, I.; Salvador, A.; A reliable and environmentally-friendly liquid-chromatographic method for multi-class determination of fat-soluble UV filters in cosmetic products. *Analytica Chimica Acta* 790 (2013) 61-67.
7. Benedé, J. L.; Chisvert, A.; Salvador, A.; Sánchez-Quiles, D.; Tovar-Sánchez, A.; Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 812 (2014) 50-58.
8. Fent, K.; Zenker, A.; Rapp, M.; Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental Pollution* 158 (2010) 1817-1824.

9. Giokas, D. L.; Salvador, A.; Chisvert, A.; UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *Trends in Analytical Chemistry* vol 26/nº 5 (2007) 360-374.
10. Manaia, E. B.; Kaminski, R. C. K.; Corrêa, M. A.; Chiavacci, L. A.; Inorganic UV filters. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol 49/nº 2 (2013) 202-209.
11. Cuderman, P.; Health, E.; Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007) 1343-1350.
12. Liao, C.; Kannan, K.; Widespread Occurrence of Benzophenone-Type UV Light Filters in Personal Care Products from China and the United States: An Assessment of Human Exposure. *Environmental Science & Technology* 48 (2014) 4103-4109.
13. Kunz, P. Y.; Fent, K.; Multiples hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology* 79 (2006) 305-324.
14. Suzuki, T.; Kitamura, S.; Khota, R.; Sugihara, K.; Fujimoto, N.; Ohta, S.; Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (2005) 9-17.
15. Kunz, P. Y.; Fent, K.; Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) - An analysis with nonlinear isobolograms. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 234 (2009) 77-88.
16. Fent, K.; Kunz, P. Y.; Zenker, A.; Rapp, M.; A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Marine Environmental Research* 69 (2010) S4-S6.
17. Jurado, A.; Gago-Ferrero, P.; Vázquez-Suñé, E.; Carrera, J.; Pujades, E.; Díaz-Cruz, M. S.; Barceló, D.; Urban ground water contamination by residues of UV filters. *Journal of Hazardous Materials* 271 (2014) 141-149.
18. Negreira, N.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Rubi, E.; Cela, R.; Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* 654 (2009) 162-170.
19. Rodil, R.; Quintana, J. B.; López-Mahía, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Prada-Rodríguez, D.; Multiclass Determination of Sunscreen Chemicals in Water Samples by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 80(4) (2008) 1307-1315.
20. Kawaguchi, M.; Ito, R.; Honda, H.; Koganei, Y.; Okanouchi, N.; Saito, K.; Seto, Y.; Nakazawa, H.; Miniaturized hollow fiber assisted liquid-phase microextraction and gas

chromatography-mass spectrometry for determination of benzophenone and derivatives in human urine sample. *Journal of Chromatography B* 877 (2009) 298-302.

21. Maijó, I.; Fontanals, N.; Francesc, B.; Neusüß, C.; Calull, M.; Aguilar, C.; Determination of UV filters in river water samples by in-line SPE-CE-MS. *Electrophoresis* 34 (2013) 374-382.

22. Zhang, Y.; Lee, H. K.; Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1249 (2012) 25-31.

23. Giokas, D. L.; Sakkas, V. A.; Albanis, T. A.; Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-photodiode array detection and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1026 (2004) 289-293.

24. Kotnik, K.; Kosjek, T.; Krajnc, U.; Heath, E.; Trace analysis of benzophenone-derived compounds in surface waters and sediments using solid-phase extraction and microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (2014) 3179-3190.

25. Negreira, N.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Rubi, E.; Cela, R.; Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 638 (2009) 36-44.

26. Lambropoulou, D. A.; Giokas, D. L.; Sakkas, V. A.; Albanis, T. A.; Karayannis, M. I.; Gas chromatographic determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyldimethyl-*p*-aminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 967 (2002) 243-253.

27. Felix, T.; Hall, M. I.; Brodbelt, J. S.; Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC-MS. *Analytica Chimica Acta* 371 (1998) 195-203.

28. Zhang, H.; Lee, H. K.; Simultaneous determination of ultraviolet filters in aqueous samples by plunger-in-needle solid-phase microextraction with graphene-based sol-gel coating as sorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 742 (2012) 67-73.

29. Haunschmidt, M.; Klampfl, C. W.; Buchberger, W.; Hertsens, R.; Determination of organic UV filters in water by stir bar sorptive extraction and direct analysis in real-time mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 269-275.

30. Kawaguchi, M.; Ito, R.; Honda, H.; Endo, N.; Okanouchi, N.; Saito, K.; Seto, Y.; Nakazawa, H.; Simultaneous analysis of benzophenone sunscreen compounds in water sample by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas

chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1200 (2008) 260-263.

31. Kawaguchi, M.; Ito, R.; Endo, N.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Saito, K.; Sato, N.; Shuozaki, T.; Nakazawa, H.; Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for trace analysis of benzophenone and its derivatives in water sample. *Analytica Chimica Acta* 557 (2006) 272-277.

32. Pedrouzo, M.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; Pocurrull, E.; Stir-bar-sorptive extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of UV filters and antimicrobial agentes in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 2833-2839.

33. Magi, E.; Carro, M. D.; Scapolla, C.; Nguyen, K. T. N.; Stir Bar Sorptive Extraction and LC-MS/MS for Trace Analysis of UV Filters in Different Water Matrices. *Chromatographia* 75 (2012) 973-982.

34. Rodil, R.; Moeder, M.; Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1179 (2008) 81-88.

35. Hilal, S. H.; Karickhoff, S. W.; Carreira, L. A.; A Rigorous Test for SPARC's Chemical Reactivity Models: Estimation of More Than 4300 Ionization pKas Quantitative Structure-Activity Relationships 14 (1995) 348-355.

36. Neng, N. R.; Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; Adsorptive micro-extraction techniques - Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7303-7310.

37. Nogueira, J. M. F.; Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta* 757 (2012) 1-10.

38. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction - Application to trace level analysis of fungicides in real matrices. *Journal of Chromatography A* 1265 (2012) 7-16.

39. Mestre, A. S.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Carvalho, A. P.; Activated carbons for the adsorption of ibuprofen. *Carbon* 45 (2007) 1979-1988.

40. Mestre, A. S.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Parra, J. B.; Carvalho, A. P.; Ania, C. O.; Waste-derived activated carbons for removal of ibuprofen from solution: Role of surface chemistry and pore structure. *Bioresource Technology* 100 (2009) 1720-1726.

41. Mestre, A. S.; Pinto, M. L.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Carvalho, A. P.; Effect of solution pH on the removal of clofibic acid by cork-based activated carbons. *Carbon* 48 (2010) 972-980.

42. Zhang, Y.; Lee, H. K.; Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* 750 (2012) 120-126.
43. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices. *Talanta* 83 (2011) 1643-1649.
44. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) with in situ derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 3155-3163.
45. Neng, N. R.; Mestre, A.S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibric acid in environmental and biological matrices. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6263-6270.
46. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (2012) 1355-1364.
47. Gonçalves, A. F. P.; Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Development of a Powdered Activated Carbon in Bar Adsorptive Micro-extraction for Heroin Metabolites Analysis. *Journal of Chromatographic Science*. 50 (2012) 574-581.
48. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.; Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous sample: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separation* 11 (1999) 737-747.
49. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Development of a stir-bar-sorptive extraction-liquid desorption-large volume injection capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (2005) 1141-1151.
50. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Considerations on ultra-trace analysis of phtalates in drinking water. *Water Research* 40 (2006) 2572-2582.
51. Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. *Talanta* 74 (2008) 1498-1504.

CAPÍTULO 7

**MELHORAMENTO DA TÉCNICA DE
MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA EM BARRA
(BA μ E) - APLICAÇÃO NA
DETERMINAÇÃO DE INSETICIDAS
REPELENTES EM MATRIZES REAIS [1]**

7.1. NOTA INTRODUTÓRIA

Os inseticidas repelentes são em geral definidos como substâncias que, após serem aplicadas na pele ou em roupas, impedem os insetos de perturbar ou “picar” o ser humano. No passado, os humanos já conheciam as propriedades repelentes de algumas plantas, usando-as como proteção contra insetos, o que ainda hoje acontece em zonas rurais. O interesse dos humanos nesta proteção, reside no facto de poderem ser transmitidas doenças através das picadas dos insetos, nomeadamente a malária ou doença de Lyme, tendo levado a um aumento do uso destes químicos nos últimos anos [2, 3].

Atualmente, um dos inseticidas mais usados como repelente de insetos é a *N,N*-dietil-*meta*-toluamida (DEET), desenvolvida pelo exército dos estados unidos da américa (EUA) com o objetivo de ser usado pelos militares em cenários de guerra, tendo sido, posteriormente, usada na população em geral. O DEET é um químico com toxicidade moderada para os humanos, embora com o uso excessivo poderem ocorrer situações de toxicidade mais elevada, levando a casos de problemas de pele, psicológicos, convulsões, entre outros [2-6]. Uma das principais vias de libertação desta substância para o ambiente, é através do escoamento de ETAR's, sendo posteriormente direcionadas para o ambiente aquático, mas também através de atividades recreativas [4, 7].

A permetrina (PERM) foi desenvolvida em 1973 pertencendo à classe dos piretróides, sendo um derivado sintético das piretrinas, constituintes naturais das plantas. Uma vez a PERM ser um inseticida com largo espectro de ação, a sua utilidade é diversificada a várias áreas, como repelente de insetos na área têxtil, na conservação da madeira, em veterinária, na agricultura, em ações de saúde pública e aplicações domésticas, sendo todas estas algumas das principais vias de entrada desta substância para o ambiente aquático [8-11, 12, 13]. Ambos os isómeros *cis* e *trans* da PERM possuem atividade como inseticidas, apesar da primeira possuir propriedades mais fortes, devendo a toxicidade ser avaliada tendo em conta a razão de ambos [9]. Apesar da PERM possuir baixa toxicidade para o homem e outros mamíferos, está relatada a ocorrência de problemas no sistema imunitário, reprodutor, cardiovascular e neurológico, possuindo toxicidade elevada para outros animais, nomeadamente para a fauna piscícola,

podendo apresentar deficiência congénitas, efeitos carcinogénicos e mutagénicos [9, 11, 14, 15].

Deste modo, são necessários métodos analíticos com sensibilidade adequada e de análise rápida, para a monitorização de níveis de concentração destes inseticidas repelentes presentes em matrizes reais. Uma vez a presença destes compostos em matrizes contaminadas, poderem ser detetados com níveis baixos de concentração ($\mu\text{g/L}$), as metodologias normalmente aplicadas para a sua determinação baseiam-se em técnicas de enriquecimento prévio à análise por técnicas cromatográficas, como a GC, HPLC ou acopladas a espectrometria de massa (GC-MS e LC-MS) [3, 8, 10, 12, 14, 16-24]. Presentemente, as técnicas de enriquecimento usados em grande escala são constituídas pelos métodos sortivos, nos quais se incluem a SPE [10, 17, 20, 21], a SPME [18] e a SBSE [3, 8, 16], sendo propostos na microextração de inseticidas repelentes em amostras aquosas. Neste sentido, a BA μ E apresenta-se como técnica de enriquecimento alternativo na análise de diversas classes de compostos em matrizes reais [25], nomeadamente quando a SBSE(PDMS) evidencia limitações [26], tendo demonstrado grande desempenho analítico em diversas aplicações [27-32], sendo possível seleccionar o sorvente mais adequado (ACs, Ps, etc.) para cada aplicação em particular. Refira-se que após o passo de microextração, a etapa de retroextração tem sido genericamente desenvolvido com dois passos antes da análise instrumental. O primeiro passo consiste na LD com recurso a 1,5 mL de solvente conveniente sob tratamento ultrassónico; o segundo passo, consiste na troca de solvente, evaporando o solvente de retroextração até à secura sob corrente suave de azoto, com posterior redissolução do resíduo noutro solvente mais compatível com o sistema de injeção instrumental. O passo da retroextração é, assim, do ponto de vista analítico um passo limitativo, exigindo manipulação prática e dispêndio de tempo.

Neste sentido, no presente estudo é proposto o melhoramento do passo da retroextração para BA μ E, constituído apenas num único passo analítico, reduzindo o volume de solvente para o nível dos microlitros (1,5 mL \rightarrow 200 μL), com eliminação simultânea da evaporação e troca de solvente. Propõe-se ainda, a redução preliminar do dispositivo BA μ E para metade do tamanho (15 mm \rightarrow

7,5 mm), no sentido da comparação da eficiência da microextração em ambos, usando quantidade diferente de sorvente.

Para avaliar estas novas abordagens foram selecionados três inseticidas repelentes (DEET, *cis*-PERM e *trans*-PERM), cujas estruturas estão apresentadas na figura 7.1, como compostos modelo em matrizes aquosas, recorrendo-se à análise por LVI-GC-MS(SIM). Para o efeito, foram efetuados, avaliados e discutidos diversos ensaios de otimização, incluindo a comparação de sorventes e interações químicas, bem como a influência de diversos parâmetros experimentais e a comparação de eficiências dos dois dispositivos analíticos. A validação e a aplicação da metodologia proposta otimizada para a determinação dos inseticidas repelentes em matrizes reais é igualmente discutida.

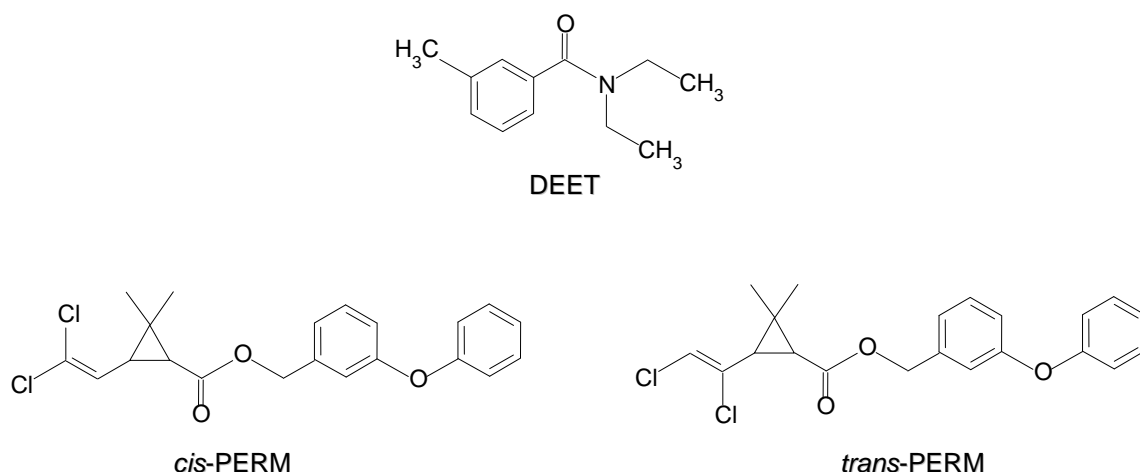


Figura 7.1 - Estruturas químicas dos inseticidas selecionados para o presente estudo.

7.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.2.1. Condições de operação instrumental

No presente estudo, foram selecionados três inseticidas repelentes (DEET, *cis*-PERM e *trans*-PERM) como compostos modelo. Numa primeira fase, começou por se otimizar as melhores condições de operação instrumental para os inseticidas selecionados, injetando-se um padrão mistura por GC-MS,

operando no modo FS. Pelos dados obtidos, através do padrão de fragmentação característico de cada inseticida, selecionou-se o íão alvo (pico base) e os principais íões fragmentados (tabela 7.1) por forma a alcançar a melhor seletividade e sensibilidade possíveis, para posterior operação no modo SIM, de acordo com trabalhos anteriores [3, 8, 17, 34]. Operando nas condições instrumentais impostas, a monitorização dos íões selecionados demonstrou resposta instrumental adequada para cada analito, bem como picos simétricos, permitindo alcançar tempos analíticos convenientes (< 14 min), sob condições cromatográficas otimizadas.

Posteriormente, por forma a incrementar a sensibilidade, fundamentalmente em matrizes reais, recorreu-se à injeção de grandes volumes, operando no modo *solvent vent* em análise por GC-MS(SIM). Por conseguinte, um volume de injeção de 20 μ L foi selecionado, uma vez volumes superiores poderem gerar ruído elevado e, consequentemente, sensibilidade reduzida [32]. Assim, foi avaliada a sensibilidade instrumental por intermédio dos LODs e LOQs, determinados pela injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos, calculados através da razão S/N igual a 3 e 10, respetivamente. Dos dados obtidos, observaram-se valores de 0,20 μ g/L para os LODs, e de 0,66 μ g/L para os LOQs. De seguida, foi efetuada a calibração instrumental com recurso à injeção de padrões de calibração contendo os três inseticidas repelentes, abrangendo concentrações desde 1,0 a 500,0 μ g/L. Nesta gama, obtiveram-se boas linearidades para todos os inseticidas, com coeficientes de determinação superiores a 0,9969. Na tabela 7.1 resumem-se todos os dados instrumentais obtidos por LVI-GC-MS(SIM), assim como a classe e os log K_{OW} para os inseticidas repelentes em estudo.

A precisão instrumental foi igualmente avaliada com recurso a injeções repetidas de padrões, tendo demonstrado valores inferiores a 18,8 % (*trans*-PERM), expressos em RSD. Provou-se, igualmente, a não existência de efeitos de memória, recorrendo à injeção de solvente.

Tabela 7.1 - Classe, log K_{OW} , m/z de íons, tempos de retenção (t_R) e coeficientes de determinação para os inseticidas repelentes em estudo obtidos por LVI-GC-MS(SIM), sob condições instrumentais otimizadas.

| Inseticidas | Classe | log K_{OW} ^a | Íons ^b (m/z) | t_R (min) | $r^{2,c}$ |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------|-----------|
| DEET | <i>N,N</i> -dialquilamida | 2,26 | <u>190</u> , 119, 91 | 4,0 | 0,9969 |
| <i>cis</i> -PERM | Piretróide | 7,43 | <u>283</u> , 263, 127 | 11,6 | 0,9977 |
| <i>trans</i> -PERM | Piretróide | 7,43 | <u>283</u> , 263, 127 | 11,8 | 0,9972 |

^a US EPA (2011) Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v. 4.1. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC;

^b Íons de quantificação (sublinhado) e qualificação;

^c Dez níveis de concentração desde 1,0 a 500,0 μ g/L.

7.2.2. Otimização da eficiência da BA μ E- μ LD(200 μ L)

Na implementação de qualquer metodologia analítica, é necessária a otimização de vários parâmetros que podem afetar a eficiência dos analitos em estudo, de modo a alcançar o máximo desempenho analítico possível. Assim, foram realizados ensaios sistemáticos por BA μ E- μ LD(200 μ L) em água ultrapura fortificada (1,0 μ g/L) com os inseticidas, para a seleção do material sorvente, tempo de extração e agitação, pH, força iônica e polaridade da matriz, assim como o tipo de solvente e tempo de retroextração, de acordo com trabalhos anteriores [27-33]. Nesta secção foram igualmente incluídos melhoramentos no passo de retroextração.

7.2.2.1. Seleção dos materiais sorventes para a BA μ E- μ LD(200 μ L)

No presente estudo, testaram-se vários sorventes para BA μ E com propriedades físico-químicas distintas, de acordo com outros trabalhos [25, 27-33]. Assim, entre estes sorventes incluem-se seis Ps (P1-P6) e cinco ACs (AC1-AC5), usados como fases sorventes para a microextração dos inseticidas selecionados em água ultrapura. Os polímeros escolhidos eram constituídos por pirrolidona modificada (P1), PS-DVB (P2), ciano (P3), troca aniônica/fase-reversa (P4), troca catiônica/fase-reversa (P5) e PDMS (P6), sendo o último usado com recurso à técnica de SBSE. Os polímeros caracterizavam-se por terem tamanhos de partícula compreendidos entre 30 e 100 μ m, tamanhos de

poros entre 70 e 260 Å e áreas superficiais entre 500 e 830 m²/g, possuindo excelente resistência à variação do pH (0-14).

Por outro lado, os ACs selecionados (AC1, AC2, AC3, AC4 e AC5) apresentavam áreas superficiais compreendidas entre 900 e 1500 m²/g e pH_{PZC} com valores de 6,4, 2,2, 7,5, 8,5 e 8,4, respectivamente, apresentando características desde ácidas a básicas. De acordo com estas propriedades, os ACs apresentavam características superficiais químicas distintas que podem ser decisivas para a seletividade na microextração dos inseticidas repelentes em estudo.

É de realçar, que os inseticidas em estudo apresentavam características desde polares a não-polares (log K_{OW} 2,26 e 7,43) (tabela 7.1), donde o DEET apresenta ionização com características básicas e a PERM além de possuir uma estrutura muito estável, não sofre qualquer tipo de ionização [35].

Assim, as propriedades de todos os materiais sorventes a testar, juntamente com as características dos inseticidas repelentes, podem ser determinantes nos mecanismos de interação envolvidos no processo de microextração. Refira-se que o DEET e a PERM possuem uma geometria estrutural distinta (figura 7.1), donde o primeiro apresenta tamanho inferior e forma geométrica mais esférica.

7.2.2.2. Seletividade dos materiais sorventes

Inicialmente, foram realizados ensaios por forma a selecionar o melhor sorvente para revestimento entre os vários materiais disponíveis, de acordo com estudos anteriores [32, 33, 36]. A figura 7.2 reproduz o perfil de recuperações médias obtidas, usando os diferentes sorventes disponíveis, ACs (AC1-AC5; figura 7.2.a) e Ps (P1-P6; figura 7.2.b), assim como a comparação entre técnicas de microextração distintas, BA μ E e SBSE, na análise de inseticidas repelentes em água ultrapura, sob condições experimentais padrão: extração - 25 mL (1,0 µg/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μ LD - ACN, 200 µL, 30 min sob tratamento ultrassónico.

A figura 7.2.a, apresenta boas recuperações para todos os ACs no caso do DEET (> 60 %), enquanto o AC1 e AC2 demonstraram recuperações superiores para o *cis*- e *trans*-PERM (> 25 %), sob condições experimentais idênticas. No caso dos ACs, estes materiais são sólidos de natureza porosa, que retêm os analitos através de interações electrostáticas e/ou dispersivas, de acordo com as propriedades texturais, área superficial e dimensão dos poros [36]. Deste modo, o pH_{PZC} de cada AC pode ter influência decisiva nos mecanismos de interação envolventes, uma vez os ACs testados apresentarem características superficiais desde ácidas a básicas, as quais são determinadas pela composição à superfície dos ACs e que dependem, em grande parte, na percentagem de eventuais heteroátomos, nomeadamente oxigénio, hidrogénio e azoto, sendo importantes na capacidade de adsorção dos ACs. Assim, para uma determinada solução na qual o pH é igual ao pH_{PZC} , a superfície do AC terá carga neutra, possuindo o mesmo número de cargas positivas e negativas. No caso do pH da amostra ser inferior ao pH_{PZC} , a carga superficial será positiva, e negativa se o pH da amostra for superior ao pH_{PZC} [28, 37, 38]. Para os ensaios realizados a pH 5,5, a carga superficial dos ACs testados, variam desde negativa (AC2), a quase neutra (AC1 e AC3) e positiva (AC4 e AC5), podendo ter um papel importante nas interações entre os sorventes e os inseticidas repelentes que são neutros para aquele valor de pH. Deste modo, a partir dos dados obtidos, podemos afirmar que quanto mais acentuadas as características ácidas do AC mais fortes serão as interações com os compostos *cis*- e *trans*-PERM, favorecendo o processo de microextração. No caso do DEET, as interações electrostáticas com os sorventes não parecem ser decisivas, parecendo por isso as dispersivas serem as determinantes.

No caso dos Ps testados, a figura 7.2.b mostra o perfil obtido para estes sorventes, onde P1 e P2 promovem interações mais fortes com o DEET, uma vez que são alcançadas melhores eficiências, e por outro lado, para a PERM, o P6 parece promover a recuperação mais elevada (> 60 %). O P6 é um sorvente à base de silicone, usado através da bem estabelecida técnica de SBSE(PDMS) que é especialmente dedicada para compostos com características apolares ($\log K_{OW} \geq 3$), promovendo mecanismos de interação hidrofóbicas (forças de *van-der-Waals*) com os compostos na forma neutra [26, 36]. Assim, uma vez a PERM

apresentar para ambos os isômeros características apolares ($\log K_{OW} = 7,43$), a eficiência é favorecida. Por outro lado, uma vez o DEET apresentar características polares ($\log K_{OW} = 2,26$), a eficiência obtida é inferior a 20 %. Para os restantes polímeros (P3, P4 e P5) obtiveram-se eficiências entre 25 e 50 % para ambas as espécies da PERM, enquanto para o DEET, as fases P3 e P5 apresentam a recuperação mais baixa e elevada, respetivamente.

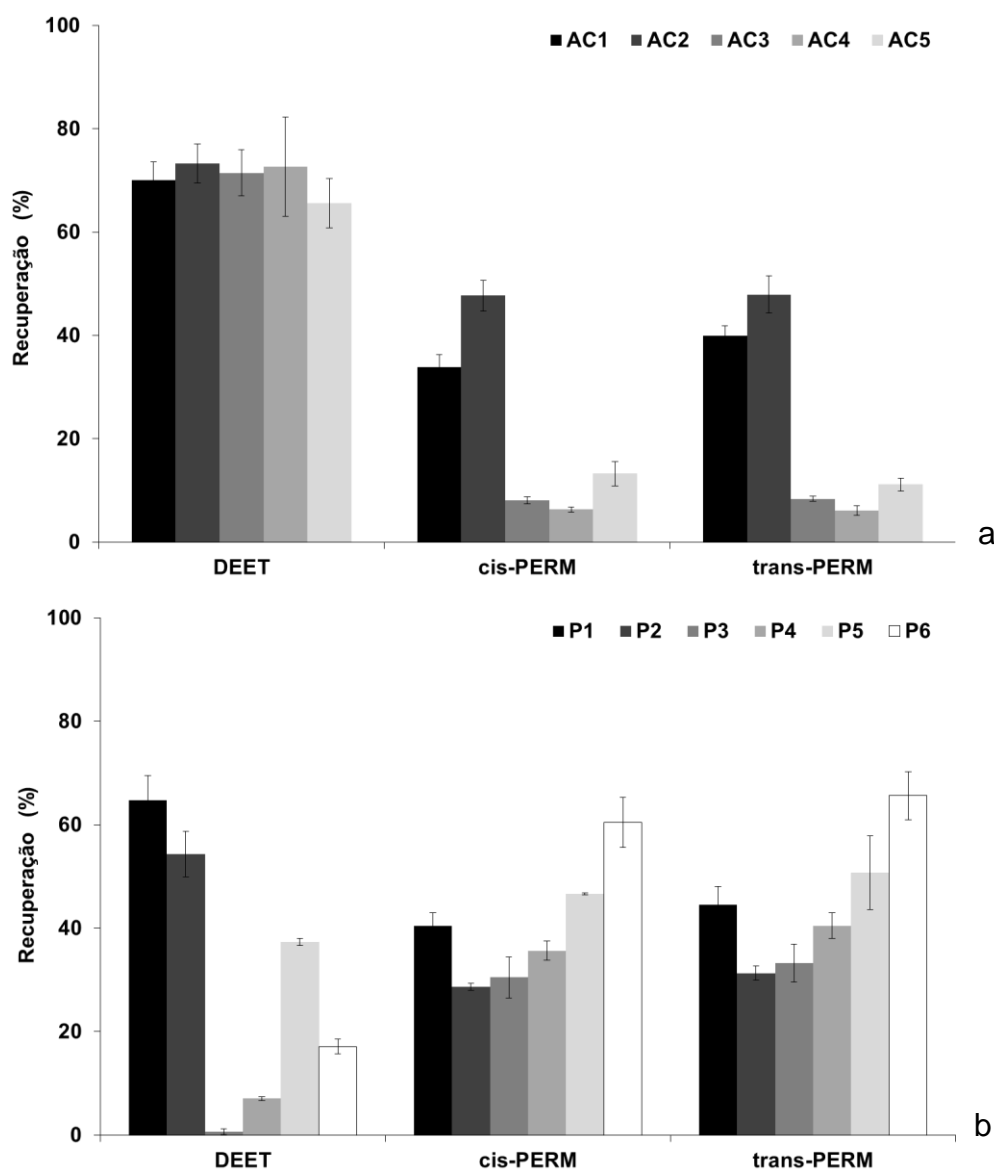


Figura 7.2 - Recuperação média obtida com diferentes ACs (a) e Ps (b) para os inseticidas em estudo em água ultrapura por BA μ E- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM), em condições experimentais padrão. Condições - extração: 25 mL (1,0 μ g/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μ LD: 200 μ L, ACN, 30 min de tratamento ultrassónico.

Duma forma geral, entre os polímeros e os inseticidas em estudo, diversos mecanismos de retenção podem ocorrer, nomeadamente de tipo π - π , dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio e interações iónicas. Uma vez os inseticidas e os sorventes poliméricos em estudo apresentarem nas suas estruturas grupos funcionais com características aromáticas, estas podem tornar-se decisivas nas interações envolvidas, em particular quando na presença das formas moleculares neutras.

Neste sentido, através dos dados obtidos, AC2 foi escolhido para estudos posteriores, uma vez que evidenciou o melhor compromisso em termos de eficiência com os analitos em estudo (> 50 %), quando comparado com os restantes sorventes, sob condições experimentais idênticas.

7.2.2.3. Melhoramentos e otimização da retroextração

Um dos objetivos no presente estudo, consiste na melhoria do passo da retroextração, através da eliminação da mudança de solvente por intermédio de evaporação e redissolução, assim como na redução do volume de solvente para a retroextração, para o nível dos microlitros. Consequentemente, o tradicional passo da retroextração (LD) foi substituído pela micro-dessorção líquida (μ LD), usando para tal um *insert* preenchido com 200 μ L de solvente adequado. Estas melhorias, tornam este passo de mais fácil execução, rápido e ambientalmente mais favorável [39, 40]. Da mesma forma, o solvente deve ser selecionado e possuir força suficiente para libertar todos os analitos presentes na fase sorvente, bem como ser compatível com sistema instrumental a utilizar para análise [41]. A figura 7.3.a apresenta uma imagem referente à nova melhoria introduzida no passo de retroextração, no qual o dispositivo analítico se encontra completamente imerso no solvente adequado dentro de um *insert*.



Figura 7.3 - Imagem que mostra o processo de μ LD para BA μ E(AC2, 1,7 mg) (a) e BA μ E(AC2, 0,9 mg) (b).

Neste sentido, diversos solventes como ACN, MeOH, misturas de ACN/MeOH (1:1, v/v) e *n*-C6 foram testados, abrangendo uma gama alargada de polaridade, por forma a garantir uma μ LD completa, retirando totalmente os inseticidas repelentes retidos na fase sorvente da BA μ E(AC2). A figura 7.4 mostra o perfil obtido nos ensaios realizados para testar os vários solventes sob ação ultrassónica, onde se verifica que o ACN parece promover melhor eficiência para os três inseticidas em estudo. De seguida, foi estudado o tempo em ultrassons durante a μ LD, onde diversos ensaios foram estudados para tempos de 15, 30, 45 e 60 min (dados não apresentados). Uma vez que não se verificaram variações significativas, selecionou-se 15 min para os estudos posteriores.

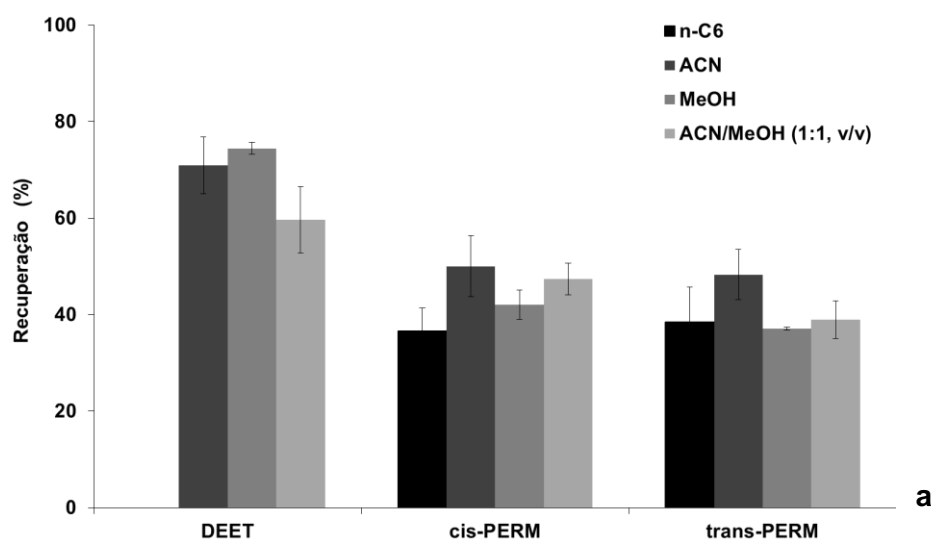


Figura 7.4 - Efeito do solvente na retroextração da BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM). Condições - extração: 25 mL (1,0 μ g/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μ LD: 200 μ L, 15 min de tratamento ultrassónico.

No sentido de averiguar possíveis retenções na BA μ E(AC2) e/ou efeitos de memória ou *carryover*, foram efetuadas μ LD consecutivas das mesmas barras de microextração e injetadas no GC-MS(SIM). Os resultados obtidos, mostraram que o ruído existente foi sempre inferior aos LODs instrumentais.

Estes melhoramentos, demonstraram que usando solventes cuidadosamente selecionados, com capacidade adequada para o processo da μ LD e compatíveis com o sistema instrumental a usar, parecem ser a opção mais vantajosa e prática. A evaporação de solvente e posterior dissolução pode assim ser eliminada, sendo executada num único passo através da μ LD, tal como proposto no presente estudo. Igualmente, as melhorias introduzidas no passo da retroextração, são eficientes, de simples e rápida execução, usando quantidades reduzidas em solvente, à escala dos microlitros, de acordo com os princípios da química verde.

7.2.2.4. Otimização da BA μ E(AC2, 1,7 mg)

O processo de microextração, baseia-se no equilíbrio entre os analitos, a fase sorvente e a matriz aquosa. Assim, por forma a controlar todo o processo de enriquecimento, entre os vários parâmetros a serem estudados e otimizados, o tempo de extração e velocidade de agitação possuem um papel fundamental, controlando a velocidade de transferência de massa entre as fases envolvidas, podendo limitar a eficiência do processo [25, 27-33, 36].

A velocidade de agitação foi o primeiro parâmetro a ser estudado, o qual é de extrema importância durante o processo de microextração, uma vez poder afetar a transferência de massa dos inseticidas repelentes para a fase sorvente, durante o processo de enriquecimento por flutuação [25, 26, 36]. Dependendo do tamanho das barras de agitação magnética usadas, velocidades elevadas (> 1000 rpm) são normalmente evitadas, uma vez que geram turbulência e perturbam o dispositivo de microextração que se encontra junto ao *vortex*, podendo originar eficiência e precisão reduzidas [8, 32, 33, 42, 43]. Assim, os resultados obtidos para as velocidades de 750, 1000 e 1250 rpm (dados não

apresentados), mostraram ligeira vantagem para 1000 rpm, tendo sido escolhida para os estudos posteriores.

O tempo de extração foi o parâmetro a ser estudado posteriormente, o qual é determinante para a interação entre os inseticidas, a fase sorvente e o meio aquoso, podendo condicionar a correspondente eficiência do processo. Deste modo, foram realizados ensaios para testar 1, 2, 3 e 16 h à temperatura ambiente. A figura 7.5.a, mostra o perfil obtido para os tempos de extração estudados, verificando-se uma cinética lenta na recuperação, tendo sido alcançada a mais elevada para as 16 h, e sido selecionada para os estudos posteriores.

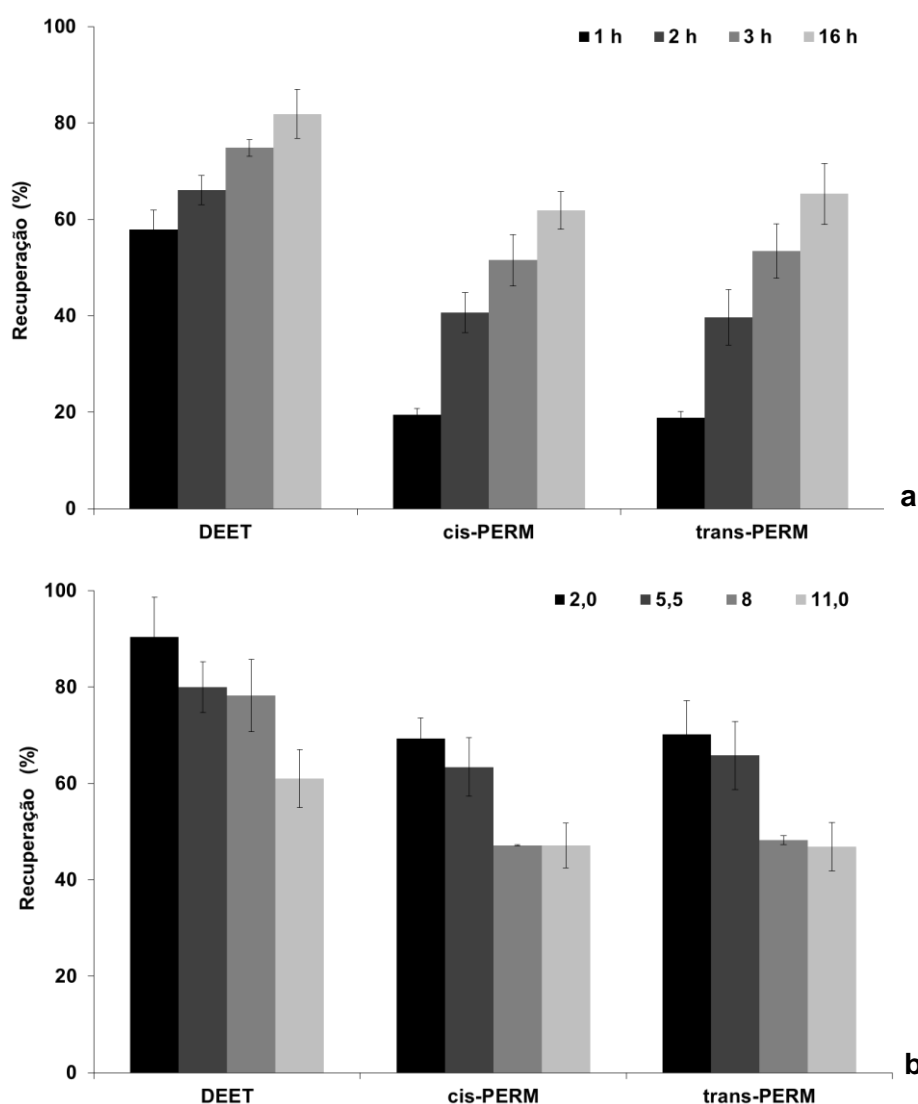


Figura 7.5 - Efeito do tempo de extração (a) e pH (b) na eficiência da BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM). Condições - (a) extração: 25 mL (1,0 μ g/L), 1000 rpm, pH 5,5; μ LD: 200 μ L ACN, 15 min ultrassons; (b) extração: 25 mL (1,0 μ g/L), 1000 rpm, 16 h; μ LD: 200 μ L ACN, 15 min de tratamento ultrassônico.

De seguida, as características da matriz foram estudadas, nomeadamente o pH, a força iónica e a polaridade. Para o pH em particular, foram realizados ensaios para avaliar o comportamento da eficiência da BA μ E(AC2) relativamente aos inseticidas repelentes em estudo, para o pH 2,0, 5,5, 8,0 e 11,0 à temperatura ambiente. O pH da matriz, é um parâmetro de elevada importância na eficiência do processo de microextração, uma vez poder afetar a carga dos analitos e da fase sorvente AC2 simultaneamente [28, 29]. Para o caso particular do DEET, a forma molecular neutra é predominante para pH superior a 2,0, e pelo contrário, para valores inferiores, a forma iónica com carga positiva prevalece. No caso da *cis*- e *trans*-PERM, estas substâncias apresentam uma estrutura estável, não sofrendo qualquer tipo de ionização [35]. A figura 7.5.b mostra o perfil obtidos dos ensaios de pH efetuados, onde se verifica que a melhor recuperação é obtida para pH 2,0. Para este valor, a carga superficial de AC2 é aproximadamente neutra ($\text{pH}_{\text{amostra}} \approx \text{pH}_{\text{PZC}}$), sendo favorável tanto para o DEET como para a PERM. Para valores de pH superiores, apesar dos três inseticidas repelentes se encontrarem na forma neutra, verifica-se redução da respetiva recuperação, podendo ser justificada pelo facto do AC2 possuir carga superficial negativa, não sendo favorável para a microextração dos analitos em estudo. Deste modo, uma vez a migração dos inseticidas repelentes para fase sorvente ser favorecida a pH 2,0, este valor foi escolhido para estudos posteriores.

A força iónica pode ser aumentada pela adição de um eletrólito, favorecendo a migração de compostos orgânicos para a fase sorvente, bem como a eficiência do processo de microextração, nomeadamente para os mais polares ($\log K_{\text{OW}} < 3$). Em geral, o aumento da recuperação dos analitos mais polares pela adição de sais, é conseguido devido ao efeito de *salting-out*, o qual é baseado na redução da solubilidade dos analitos, promovendo a migração dos mesmos para a fase sorvente [28, 32, 44]. Neste sentido, foram realizados ensaios em água ultrapura com adição de NaCl contendo percentagem de 0, 5, 10 e 15 % (p/v) à temperatura ambiente. Do perfil de resultados obtidos (dados não apresentados), ocorre um ligeiro aumento na recuperação do DEET para 15 %, embora para a PERM ocorra um decréscimo significativo na recuperação, nomeadamente para 10 e 15 %. O efeito existente da força iónica, deve-se ao

carácter hidrofílico do DEET no qual a adição de NaCl força as moléculas a deslocarem-se na direção da fase sorvente, embora para a PERM ocorrer redução da solubilidade na matriz devido à sua elevada hidrofobicidade.

No caso da polaridade da matriz, esta pode ser alterada ou controlada pela adição dum solvente orgânico, o qual reduz o *wall-effect*. Este fenómeno baseia-se na adsorção dos compostos com características mais hidrofóbicas às paredes de vidro dos frascos de amostragem, o que pode reduzir a eficiência do processo de microextração [29, 32, 45]. Neste sentido, foram realizados ensaios com a adição de MeOH na percentagem de 0, 5, 10 e 15 % (v/v) em água ultrapura e à temperatura ambiente. O perfil de dados obtido neste parâmetro, mostra que a eficiência do DEET é fortemente reduzida, embora para a PERM a variação não seja significativa. O efeito observado para o DEET, deve-se ao facto de ser hidrofílico, ocorrendo aumento da solubilidade em solução, enquanto para a PERM, apesar de possuir características hidrofóbicas, não ficam retidas nas paredes dos frascos de amostragem, uma vez ter-se verificado variações negligenciáveis. Deste modo, os estudos posteriores foram realizados na ausência de adição de NaCl e MeOH.

7.2.3. Validação da metodologia BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM)

Após terminado o passo de otimização, prosseguiu-se o estudo de validação do método BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM), com as seguintes condições experimentais otimizadas: BA μ E(AC2, 1,7 mg) - 25 mL, 1000 rpm, 16 h, pH 2,2; μ LD - ACN, 200 μ L, 15 min com tratamento em ultrassons. Por forma a avaliar a eficiência da metodologia proposta, foram realizados ensaios em 25 mL de água ultrapura fortificada (1,0 μ g/L), tendo-se obtido eficiências de $96,4 \pm 9,9$ % para o DEET, $76,5 \pm 13,9$ % para a *cis*-PERM e $73,8 \pm 8,8$ % para a *trans*-PERM, nas condições experimentais otimizadas. Relativamente à sensibilidade da presente metodologia, foi averiguada através do cálculo dos limiares analíticos, tendo-se alcançado LODs de 8,0 ng/L (*cis*- e *trans*-PERM) e 20 ng/L (DEET), e LOQs de 26 ng/L (*cis*- e *trans*-PERM) e 66 ng/L (DEET), determinados através da razão S/N, de respetivamente 3 e 10. A

calibração da metodologia foi igualmente efetuada em água ultrapura, numa gama de concentrações compreendida entre 0,04 e 4,0 $\mu\text{g/L}$, tendo apresentado boa linearidade com coeficientes de determinação (r^2) inferiores a 0,9963 (DEET) e precisões inferiores a 15,2 % (1,6 $\mu\text{g/L}$, *trans*-PERM). A tabela 7.2, resume a recuperação experimental obtida, os dados de calibração e os limiares analíticos dos inseticidas repelentes para a metodologia BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μL)/LVI-GC-MS(SIM), sob a condições experimentais otimizadas.

Tabela 7.2 - Recuperação média, LODs, LOQs, calibração e coeficientes de determinação obtidos para os inseticidas em estudo, através do método BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μL)/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

| Inseticidas | Recuperação ^a (% \pm RSD) | LODs ($\mu\text{g/L}$) | LOQs ($\mu\text{g/L}$) | Calibração ($\mu\text{g/L}$) | r^2 |
|--------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|--------|
| DEET | 96,4 \pm 9,9 | 20 | 66 | 0,08-4,0 ^b | 0,9963 |
| <i>cis</i> -PERM | 76,5 \pm 13,9 | 8 | 26 | 0,04-4,0 ^c | 0,9965 |
| <i>trans</i> -PERM | 73,8 \pm 8,8 | 8 | 26 | 0,04-4,0 ^c | 0,9972 |

^a Ensaios a 1,0 $\mu\text{g/L}$; n = 3;

^b Oito níveis de concentração;

^c Nove níveis de concentração.

Posteriormente, foi ainda avaliada a repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes da metodologia proposta. Para o efeito, foram realizados ensaios em triplicado em água ultrapura para um nível de 0,2, 0,6, 1,0 e 1,6 $\mu\text{g/L}$ no mesmo dia, e ao nível de 1,0 $\mu\text{g/L}$ em três dias diferentes. Para a repetibilidade no mesmo dia, verificou-se boa concordância na eficiência com recuperações desde 64,3 % (*cis*-PERM, 1,6 $\mu\text{g/L}$) a 98,4 % (DEET, 0,6 $\mu\text{g/L}$), assim como boas precisões alcançadas, abrangendo desde 6,3 % (*trans*-PERM, 0,6 $\mu\text{g/L}$) a 14,9 % (*trans*-PERM, 1,6 $\mu\text{g/L}$). No que respeita à repetibilidade em dias diferentes para um nível de 1,0 $\mu\text{g/L}$, as eficiências e precisões obtidas foram de 96,7 \pm 9,0 % para o DEET, 72,7 \pm 10,5 % para a *cis*-PERM e 70,2 \pm 11,9 % para a *trans*-PERM. Na figura 7.6 pode observar-se os resultados de repetibilidade obtidos para BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μL)/LVI-GC-MS(SIM).

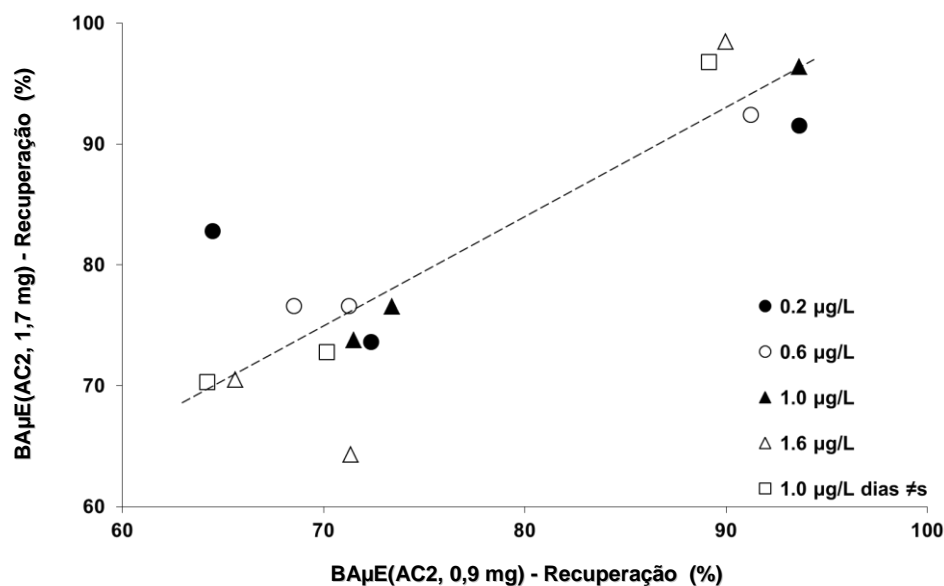


Figura 7.6 - Comparação da recuperação para os três inseticidas repelentes entre BA μ E(AC2, 1,7 mg) e BA μ E(AC2, 0,9 mg), seguido de μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

A figura 7.7 mostra um fragmentograma relativo a um ensaio de recuperação fortificado para um nível de 1,0 μ g/L, e obtido por BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM), nas condições experimentais otimizadas, onde é notório o excelente desempenho analítico.

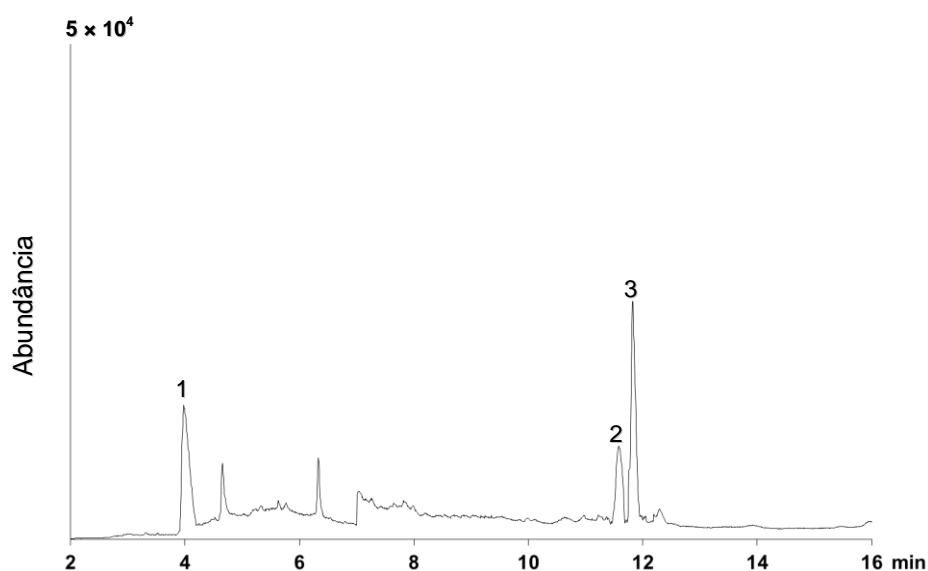


Figura 7.7 - Fragmentograma resultante de ensaio de recuperação a 1,0 μ g/L obtido por BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-DEET, 2-*cis*-PERM, 3-*trans*-PERM.

Em resumo, os avanços introduzidos no passo da retroextração da presente metodologia, mostraram bom desempenho analítico, tendo-se obtido boa eficiência e repetibilidade. A metodologia torna-se assim ambientalmente mais favorável, de execução mais fácil e rápida, tendo demonstrado boa seletividade e sensibilidade na monitorização de inseticidas repelentes em matrizes ambientais com elevado grau de complexidade.

7.2.4. Melhoramentos no dispositivo analítico - Redução da BA μ E

Apesar de se terem obtido bons resultados analíticos com recurso à metodologia otimizada (BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM)), um dos objetivos deste estudo foi reduzir o dispositivo de microextração para metade do seu tamanho (BA μ E(AC2, 0,9 mg)) e testar o correspondente desempenho analítico, sob condições experimentais otimizadas. Na figura 7.8, encontra-se ilustrada a geometria de ambos os dispositivos, sendo que a BA μ E(AC2, 0,9 mg) possui metade do tamanho da BA μ E(AC2, 1,7 mg).

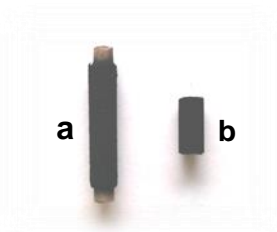


Figura 7.8 - Imagem que mostra a geometria da BA μ E(AC2, 1,7 mg) (a) e da BA μ E(AC2, 0,9 mg) (b).

Neste sentido, foram efetuados ensaios com BA μ E(AC2, 0,9 mg) que usa metade da quantidade de sorvente, para diferentes níveis de concentração no mesmo dia e em três dias diferentes, de modo a verificar se a eficiência deste dispositivo é semelhante à eficiência da BA μ E(AC2, 1,7 mg). A figura 7.6, mostra os resultados obtidos através do dispositivo BA μ E(AC2, 0,9 mg), comparando a eficiência com BA μ E(AC2, 1,7 mg), nas mesmas condições experimentais. Os resultados obtidos para BA μ E(AC2, 0,9 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM), mostra recuperações desde $64,5 \pm 9,5$ % (*trans*-PERM, 0,2 μ g/L) a $93,7 \pm 6,3$ %

(DEET, 0,2 μ g/L), enquanto para a BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM) a eficiência é de $64,3 \pm 13,5$ % (*cis*-PERM, 1,6 μ g/L) a $98,4 \pm 7,9$ % (DEET, 1,6 μ g/L). Relativamente às eficiências obtidas em dias diferentes para um nível de 1,0 μ g/L, obtiveram-se recuperações para BA μ E(AC2, 0,9 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM) de $89,2 \pm 9,5$ % (DEET), $70,2 \pm 12,4$ % (*cis*-PERM) e $64,3 \pm 11,3$ % (*trans*-PERM), enquanto para a BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM) recuperações de $96,7 \pm 9,0$ % (DEET), $72,7 \pm 10,5$ % (*cis*-PERM) e $70,2 \pm 11,9$ % (*trans*-PERM). Através da comparação das eficiências obtidas para ambos os dispositivos, podemos afirmar que os resultados obtidos são equivalentes, com pequenas variações. Uma vez que estes materiais apresentam áreas superficiais elevadas, a capacidade de adsorção é igualmente elevada, apresentando-se abaixo da saturação do sorvente. É de realçar, que com a redução do dispositivo para metade, há um aumento de razão de fase para o solvente, podendo ser vantajoso para uma retroextração mais eficiente, conforme é visível na figura 7.3.b. No entanto, ao reduzir a barra para BA μ E(AC2, 0,9 mg), poderá ser uma alternativa para reduzir ainda mais o volume de solvente a usar na retroextração, sem comprometer a respetiva eficiência.

7.2.5. Aplicação da metodologia BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM) a matrizes reais

A aplicação a matrizes reais, é um passo importante por forma a demonstrar a capacidade analítica da metodologia BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM). Para o efeito, a metodologia proposta foi aplicada a diversas matrizes, nomeadamente água da torneira, subterrânea, de rio, estuarina e de piscina. Por forma a minimizar eventuais efeitos existentes nas matrizes reais com elevada complexidade, recorreu-se ao SAM para quantificação dos inseticidas repelentes em estudo, como já efetuado noutros estudos para diferentes compostos [27-33]. As amostras reais foram fortificadas com quatro níveis de concentração desde 0,6 a 2,8 μ g/L constituídos pela mistura dos inseticidas repelentes, efetuando igualmente o ensaio em branco sem qualquer fortificação (C_0). A tabela 7.3 resume os resultados obtidos pelo

SAM nas matrizes reais estudadas, sob condições experimentais otimizadas, onde se observa boa linearidade com r^2 superior a 0,9941 (*trans*-PERM). Relativamente aos declives obtidos, verifica-se que a água da torneira e subterrânea apresentam a mesma ordem de grandeza em termos de sensibilidade, enquanto a água de rio mostra ser a matriz com a sensibilidade mais elevada. A água estuarina e de piscina apresentaram a sensibilidade mais reduzida, o que se pode ficar a dever à presença de efeitos de matriz, nomeadamente em conteúdo salino.

Tabela 7.3 - Declives e coeficientes de determinação obtidos para os inseticidas repelentes em estudo através do SAM nas matrizes reais estudadas, pelo método BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

| Inseticidas repelentes | Água de torneira | | Água Subterrânea | | Água estuarina | | Água de rio | | Água de piscina | |
|------------------------|------------------|--------|------------------|--------|----------------|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| | Declive | r^2 | Declive | r^2 | Declive | r^2 | Declive | r^2 | Declive | r^2 |
| DEET | 361661 | 0,9955 | 307158 | 0,9943 | 225306 | 0,9951 | 817515 | 0,9967 | 251840 | 0,9962 |
| <i>cis</i> -PERM | 239352 | 0,9953 | 266112 | 0,9973 | 184375 | 0,9943 | 426093 | 0,9960 | 158083 | 0,9946 |
| <i>trans</i> -PERM | 1×10^6 | 0,9958 | 1×10^6 | 0,9979 | 815407 | 0,9955 | 2×10^6 | 0,9941 | 619741 | 0,9944 |

Apesar da metodologia proposta apresentar boa sensibilidade, não foram detetados vestígios dos analitos em estudo (< LODs) nas matrizes reais estudadas.

7.3. CONCLUSÕES

A metodologia proposta, BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM), no presente estudo, usando uma fase sorvente seletiva, foi desenvolvida, otimizada e validada para a monitorização simultânea de três inseticidas repelentes (DEET, *cis*- e *trans*-PERM) em matrizes aquosas ambientais. Nas condições experimentais otimizadas, obteve-se excelente desempenho analítico, incluindo boa eficiência, precisão adequada, limiares analíticos ao nível dos ppt's e boa gama linear dinâmica. A aplicação da metodologia a matrizes reais, nomeadamente água da torneira, subterrânea,

estuarina, de rio e de piscina para a monitorização dos inseticidas repelentes em estudo, demonstrou excelente desempenho analítico com recurso ao SAM.

Os melhoramentos propostos à BA μ E, nomeadamente no passo da retroextração, com redução do volume de solvente, eliminação do passo de troca de solvente e respetiva evaporação à secura e redissolução, mostraram excelente comportamento analítico, assim como maior facilidade na execução e implementação experimental, sendo mais rápida, mais simples e ambientalmente mais favorável. A redução do dispositivo analítico, usando metade da quantidade em sorvente, mostrou igualmente bom desempenho analítico, não comprometendo a eficiência do processo de microextração.

A metodologia proposta (BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/LVI-GC-MS(SIM)), que opera sob tecnologia de amostragem por flutuação, demonstrou ser uma excelente alternativa para a análise de inseticidas repelentes, sendo possível selecionar a fase sorvente mais adequada aos analitos em estudo, quando outras técnicas sortivas, nomeadamente o SBSE(PDMS), que operam no modo estático apresentam baixa eficiência.

7.4. REFERÊNCIAS

1. Almeida, C.; Strzelczyk, R.; Nogueira, J. M. F.; Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique-Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices. *Talanta* 120 (2014) 126-134.
2. Maia, M. F.; Moore, S. J.; Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 10(Suppl 1):S11 (2011) 1-15.
3. Rodil, R.; Moeder, M.; Stir bar sorptive extraction coupled to thermodesorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of insect repelling substances in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1178 (2008) 9-16.
4. Constanzo, S. D.; Watkinson, A. J.; Murby, E. J.; Kolpin, D. W.; Sandstrom, M. W.; Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments?. *Science of the total Environment* 384 (2007) 214-220.

5. Usmani, K. A.; Rose, R. L.; Goldstein, J. A.; Taylor, W. G.; Brimfield, A. A.; Hodgson, E.; In vitro human metabolism and interactions of repellent N,N-diethyl-m-toluamide. *Drug Metabolism and Disposition* 30(3) (2002) 289-294.
6. Kuklenyik, P.; Baker, S. E.; Bishop, A. M.; Morales-A, P.; Calafat, A. M.; On-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography–isotope dilution–tandem mass spectrometry approach to quantify N,N-diethyl-m-toluamide and oxidative metabolites in urine. *Analytica Chimica Acta* 787 (2013) 267–273.
7. Kim, I. S.; Ren, X.; Chang, J.-S.; Lee, J.W.; Yu, H.-W.; Kim, S.-J.; Heo, J.S.; Jang, A.; Han, H.J.; The Effect of Environmental Micropollutant (DEET) on the Expression of Cell Cycle and Apoptosis Regulatory Proteins in Human Cells, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16 (2011) 400-406.
8. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Development of a stir-bar-sorptive extraction–liquid desorption–largevolume injection capillary gas chromatographic–mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2005) 1141-1151.
9. Turner, T.; Cartmell, E.; Lester, J.N.; Casse, F.; Comber, S.D.W.; Scrimshaw, M.D.; The pharmaceutical use of permethrin: Sources and Behavior During Municipal Sewage treatment. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 61 (2011) 193-201.
10. Yu, X.; Sun, Y.; Jiang, C.; Sun, X.; Gao, Y.; Wang, Y.; Zhang, H.; Song, D.; Magnetic solid-phase extraction of five pyrethroids from environmental water samples followed by ultrafast liquid chromatography analysis. *Talanta* 98 (2012) 257-264.
11. Anadón, A.; Martínez-Larrañaga, M. R.; Martínez, M. A.. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal* 182 (2009) 7-20.
12. Tong, J.; Chen, L.; Determination of pyrethroids in environmental waters using magnetic chitosan extraction coupled with high performance liquid chromatography detection. *Analytical Letters* 46 (2013) 1183-1197.
13. Weston, D. P.; Ramil, H. L.; Lydy, M. J.; Pyrethroid insecticides in municipal wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 32/No. 11 (2013) 2460-2468.
14. Li, C.; Chen, L.; Determination of Pyrethroid Pesticides in Environmental Waters Based on Magnetic Titanium Dioxide Nanoparticles Extraction Followed by HPLC Analysis. *Chromatographia* 76 (2013) 409-417.
15. Wang, Y; Sun, Y.; Gao, Y; Xu, B.; Wu, Q.; Zhang, H; Song, D.; Determination of five pyrethroids in tea drinks by dispersive solid phase extraction with polyaniline-coated magnetic particles. *Talanta* 119 (2014) 268-275.

16. Pintado-Herrera, M. G.; González-Mazo, E.; Lara-Martín, P. A.; Environmentally friendly analysis of emerging contaminants by pressurized hot water extraction-stir bar sorptive extraction-derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 401-411.
17. Chen, Z.-F. ; Yin, G.-G.; Lai, H.-J.; Chen, F.; Su, H.-C.; Liu, Y.-S.; Peng, F.-Q.; Zhao, J.-L.; Determination of biocides in different environmental matrices by use of ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404 (2012) 3175-3188.
18. Frenich, A. G.; Romero-González, R.; Vidal, J. L. M.; Ocaña, R. M.; Fera, P. B.; Comparison of solid phase microextraction for the determination of pesticides in aqueous samples by gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (2011) 2043-2059.
19. Pinheiro, A. S.; Rocha, G. O.; Andrade, J. B.; A SDME/GC–MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Microchemical Journal* 99 (2011) 303-308.
20. Trenholm, R. A.; Vanderford, B. J.; Drewes, J. E.; Snyder, S. A.; Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1190 (2008) 253-262.
21. Portolés, T.; Pitarch, E.; López, F. J.; Hernández, F.; Development and validation of a rapid and wide-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural water and wastewater by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 303-315.
22. Mukdasai, S; Thomas, C.; Srijaranai, S.; Two-step microextraction combined with high performance liquid chromatographic analysis of pyrethroids in water and vegetable samples. *Talanta* 120 (2014) 289-296.
23. Yu, C.; Zhang, S.; Zhang, J.; Li, S.; Zhou, W.; Gao, H.; Lu, R.; An *in situ* Ionic Liquid Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Detection of Pyrethroids by LC-UV in Environmental Water Samples. *Journal of Brazilian Chemistry Society* Vol. 24/No. 6 (2013) 1034-1040.
24. Lin, C.-H.; Ponnusamy, V. K.; Li, H.-P.; Jen, J.-F.; Fast Analysis of Synthetic Pyrethroid Metabolites in Water Samples Using In-Syringe Derivatization Coupled Hollow Fiber Mediated Liquid Phase Microextraction with GC-ECD. *Chromatographia* 76 (2013) 75-83.
25. Neng, N. R.; Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; Adsorptive micro-extraction techniques-Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7303-7310.

26. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.; Stir Bar Sorptive extraction (SBSE) a novel Extraction Technique for aqueous samples: Theory and Principles. *Journal of Microcolumn Separations* 11 (1999) 737-747.
27. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) with in situ derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 3155-3163.
28. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices. *Talanta* 83 (2011) 1643-1649.
29. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibric acid in environmental and biological matrices. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6263-6270.
30. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 1355-1364.
31. Gonçalves, A. F. P.; Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Development of a Powdered Activated Carbon in Bar Adsorptive Micro-Extraction for the Analysis of Morphine and Codeine in Human Urine. *Journal of Chromatographic Science* 50 (2012) 574-581.
32. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction - Application to trace level analysis of fungicides in real matrices, *Journal of Chromatography A* 1265 (2012) 7-16.
33. Almeida, C.; Stępkowska, A.; Alegre, A.; Nogueira, J. M. F.; Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A*, 1311 (2013) 1-10.
34. Cherstniakova, S. A.; Garcia, G. E.; Strong, J.; Bi, D.; Weitz, J.; Roy, M. J.; Cantilena, L. R.; Rapid Determination of N,N-Diethyl-m-Toluamide and Permethrin in Human Plasma by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Pyridostigmine Bromide by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Toxicology* 30 (2006) 21-26.
35. Hilal, S. H.; Karickhoff, S. W.; Carreira, L. A.; A Rigorous Test for SPARC's Chemical Reactivity Models: Estimation of More Than 4300 Ionization pK_as Quantitative Structure-Activity Relationships 14 (1995) 348-355.

36. Nogueira, J. M. F.; Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta* 757 (2012) 1-10.
37. Mestre, A. S.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Parra, J. B.; Carvalho, A. P.; Ania, C. O.; Waste-derived activated carbons for removal of ibuprofen from solution: Role of surface chemistry and pore structure. *Bioresource Technology* 100 (2009) 1720-1726.
38. Mestre, A. S.; Pinto, M. L.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Carvalho, A. P.; Effect of solution pH on the removal of clofibric acid by cork-based activated carbons. *Carbon* 48 (2010) 972-980.
39. Pena-Pereira, F.; Duarte, R. M. B. O.; Duarte, A. C.; Considerations on the application of miniaturized sample preparation approaches for the analysis of organic compounds in environmental matrices. *Central European Journal of Chemistry* 10(3) (2012) 433-449.
40. Koel, M.; Kaljurand, M.; Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. *Pure Applied Chemistry* vol. 78/nº 11 (2006) 1993-2002.
41. Coelho, E.; Perestrelo, R.; Neng, N. R.; Câmara, J. S.; Coimbra, M. A.; Nogueira, J. M. F.; Rocha, S. M.; Optimisation of stir bar sorptive extraction and liquid desorption combined with large volume injection-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry for the determination of volatile compounds in wines. *Analytical Chimica Acta* 624 (2008) 79-89.
42. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water. *Water Research* 40 (2006) 2572-2582.
43. Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. *Talanta* 74 (2008) 1498-1504.
44. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 1303-1311.
45. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. *Analytical Chimica Acta* 517 (2004) 21-32.

CAPÍTULO 8

**DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE
CONCENTRAÇÃO DE PARABENOS EM
MATRIZES REAIS POR MICROEXTRAÇÃO
ADSORTIVA EM BARRA (BA μ E) USANDO
FASES SORVENTES SELETIVAS [1]**

8.1. NOTA INTRODUTÓRIA

A preocupação dos humanos em aumentar a durabilidade de diversos tipos de produtos, remonta desde há muitos anos, devido à invasão de microrganismos como os fungos e/ou bactérias. A maneira mais eficaz de preservar as propriedades e valor nutritivo de diversos produtos comerciais, é através da adição de conservantes ou agentes antimicrobianos. Estes são, por definição, substâncias que protegem ou inibem a decomposição de inúmeros produtos. Um grupo de conservantes mais usado atualmente e introduzido em 1920, são designados por parabenos ou ésteres do ácido 4-hidroxibenzóico. Os parabenos, em particular o metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, benzilparabeno, isopropil e isobutilparabeno, entre outros, são largamente usados individualmente ou combinados em diversos produtos, entre os quais o metilparabeno e o propilparabeno dominam o uso em grande escala. Os parabenos são usados em inúmeros produtos, onde se destacam os cremes, loções, shampoos, sabonetes, gel de banho e barbear, pasta de dentes, produtos farmacêuticos, mas também em alimentos enlatados, bebidas e produtos para crianças [2-6].

Uma das principais fontes de libertação dos parabenos, advém de atividades humanas, estando posteriormente presentes em águas residuais, e continuamente libertadas para o ambiente aquático, entrando assim na cadeia alimentar dos animais. Assim, existe grande preocupação relativamente aos potenciais riscos associados ao uso dos parabenos nos humanos e animais, podendo-se destacar possíveis efeitos carcinogénicos e estrogénicos [2, 3, 7].

Uma vez os parabenos poderem ser encontrados em matrizes reais, nomeadamente águas e urinas, com diferentes níveis de concentração, mas também no controlo do conteúdo em diversas formulações cosméticas, são necessárias procedimentos para enriquecimento prévio à análise por técnicas cromatográficas e/ou hifenadas [3, 8]. Atualmente, as técnicas de enriquecimento frequentemente usadas para a determinação de parabenos em diversas matrizes são constituídas pelos métodos sortivos, nos quais se incluem a SPE [2, 3, 9-11], a SPME [12-14] e a SBSE [8, 15-17], apesar de alguns procedimentos recorrerem a derivatizações indesejáveis. Neste contexto, a

BA μ E apresenta-se como uma técnica de microextração sortiva alternativa [18], tendo vindo a demonstrar grande desempenho analítico na análise de diversas classes de compostos em matrizes reais de diverso tipo [18-27]. No entanto, apesar do potencial analítico da BA μ E, novos melhoramentos foram recentemente introduzidos [26], nomeadamente a redução do volume de solvente à escala dos μ L com simultânea eliminação do passo de troca de solvente na etapa da retroextração, bem como proposta a redução do dispositivo analítico para metade do tamanho (15 mm \rightarrow 7,5 mm). A redução do volume de solvente, demonstrou uma metodologia ambientalmente mais favorável, mais rápida e de fácil execução experimental. Por outro lado, o uso de menor quantidade de material sorvente provou não comprometer a eficiência da microextração analítica, tendo os ensaios preliminares demonstrado excelente desempenho.

No presente estudo, é proposta uma nova abordagem recorrendo à aplicação dos novos melhoramentos recentemente introduzidos na técnica de BA μ E seguida da micro-dessorção líquida e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por rede de díodos (BA μ E- μ LD/HPLC-DAD), e comparada com a técnica SBSE(PDMS). Para avaliar o desempenho analítico da metodologia proposta, foram selecionados quatro parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno) como compostos modelo em matrizes reais (figura 8.1). A otimização, avaliação e discussão da presente metodologia, incluiu a comparação de sorventes e interações químicas, assim como a influência de diversos parâmetros experimentais e comparação da eficiência dos dois dispositivos analíticos. A validação e a aplicação da metodologia proposta totalmente otimizada para a determinação dos quatro parabenos em diversos tipos de águas, urina e produtos cosméticos é igualmente discutida.

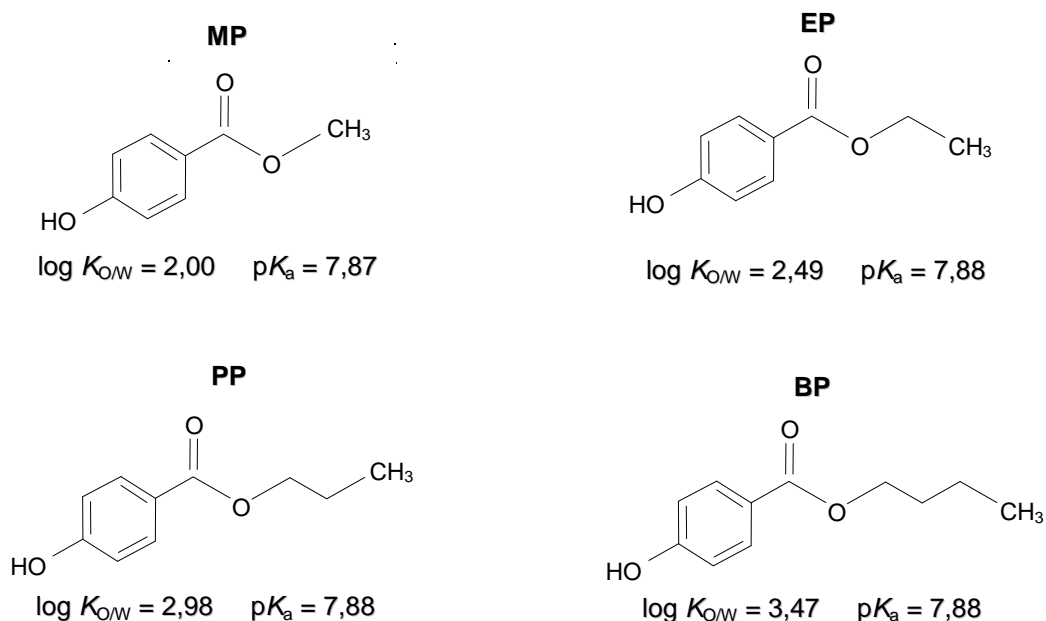


Figura 8.1 - Estruturas químicas dos quatro parabenos selecionados para o presente estudo.

8.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.2.1. Condições de operação instrumental

No presente estudo, quatro parabenos (MP, EP, PP e BP) foram selecionados como compostos modelo cujas estruturas estão presentes na figura 8.1, assim como os valores de $\log K_{OW}$ [28] e pK_a [29]. Por forma a obter as melhores condições de operação instrumental para os parabenos selecionados, começou por se injetar os padrões individuais no sentido da determinação do tempo de retenção, resolução e espectro de absorção UV/vis, tendo-se posteriormente injetado padrões constituídos pela mistura dos parabenos em estudo, no sentido da verificação da resolução cromatográfica. De acordo com os dados obtidos, selecionou-se o comprimento de onda de 257 nm, uma vez corresponder ao máximo de absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) para os quatro parabenos. A fase móvel constituída por MeOH (35 %) e H₂O (65 %) com uma coluna convencional de fase reversa (25 °C), seguida por separação cromatográfica com recurso a gradiente, permitiu obter boa resposta instrumental com boa resolução para os parabenos em estudo, em tempo analítico adequado (< 15 min).

Posteriormente, foi determinada a sensibilidade instrumental com recurso aos LODs e LOQs, pela injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos, calculados através da razão S/N igual a 3 e 10, respetivamente. Neste sentido, obtiveram-se valores de 7,0 µg/L e 23,0 µg/L para os LODs e LOQs, respetivamente, para os quatro parabenos em estudo. De seguida, a calibração instrumental foi efetuada com recurso à injeção de padrões de calibração constituídos pelos quatro parabenos, abrangendo concentrações desde 25 a 2000 µg/L, num total de treze níveis. Na gama estudada, obtiveram-se boas linearidades para os quatro parabenos, com coeficientes de determinação superiores a 0,9989 (MP). A precisão instrumental foi igualmente avaliada através da injeção consecutiva dos padrões de calibração, o que mostrou valores inferiores a 10,2 % (1,2 mg/L, MP), expressos em RSD. Refira-se ainda, que a injeção de solvente permitiu verificar a não ocorrência de efeitos de memória. Na tabela 8.1, resumem-se os dados instrumentais obtidos por HPLC-DAD, para os quatro parabenos em estudo.

Tabela 8.1 - Log K_{ow} , pK_a , tempos de retenção (t_R), comprimento de onda máximo, limiares analíticos e coeficientes de determinação para os parabenos em estudo obtidos por HPLC-DAD, sob condições instrumentais otimizadas.

| Parabenos | log K_{ow} ^a | pK_a ^b | t_R (min) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) | LODs (µg/L) | LOQs (µg/L) | r^2 ^c |
|-----------|---------------------------|---------------------|----------------|---------------------------------|----------------|----------------|--------------------|
| MP | 2,00 | 7,87 | 6,0 | 257 | 7,0 | 23,0 | 0,9989 |
| EP | 2,49 | 7,88 | 8,4 | 257 | 7,0 | 23,0 | 0,9997 |
| PP | 2,98 | 7,88 | 10,7 | 257 | 7,0 | 23,0 | 0,9998 |
| BP | 3,47 | 7,88 | 12,7 | 257 | 7,0 | 23,0 | 0,9998 |

^a US EPA (2011) Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v. 4.1. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC;

^b [29];

^c Treze níveis de concentração desde 25 a 2,000 µg/L.

8.2.2. Caracterização das fases sorventes para BAμE

No presente estudo, começou por se testar diversas fases sorventes para revestimento da BAμE contendo propriedades físico-químicas distintas, de acordo com outros trabalhos [18, 23, 25-27]. Assim, entre os sorventes estudados, incluem-se seis Ps (P1-P6) e cinco ACs (AC1-AC5), usados como

fases para a microextração dos parabenos selecionados em água ultrapura. Os seis Ps, são compostos por PS-DVB (P1 e P2), pirrolidona modificada (P3), troca catiónica/fase-reversa (P4), troca aniónica/fase-reversa (P5) e ciano (P6), os quais são caracterizadas por terem tamanhos de partículas entre 30 e 120 μ m, tamanho de poro entre 70 e 260 Å e áreas superficiais entre 500 e 1200 m²/g, assim como grande estabilidade à variação de pH (0-14). A técnica de SBSE(PDMS) (P7) foi igualmente avaliada de modo a comparar o desempenho analítico desta com a BA μ E.

Por outro lado, os ACs selecionados apresentam áreas superficiais compreendidas entre 900 e 1500 m²/g e pH_{PZC} de 6,4, 2,2, 8,4, 7,5 e 8,5, para AC1, AC2, AC3, AC4 e AC5, respetivamente. De acordo com estas propriedades, estes ACs apresentam características químicas superficiais distintas, desde ácidos, básicos e aproximadamente neutros, que podem ser decisivas para a seletividade na microextração dos parabenos em estudo.

Os quatro parabenos em estudo, apresentam características ácidas, uma vez que, sendo compostos constituídos por grupos hidroxilo, sofrem desprotonação desde valores de pH compreendidos entre 5,5 e 6,0 e superiores [29]. Os parabenos em estudo, possuem igualmente características desde polares a semi-polares ($2,00 \leq \log K_{OW} \leq 3,47$), podendo ser determinantes para os mecanismos de interação com as fases sorventes, durante o processo de microextração.

8.2.3. Seletividade das fases sorventes

Numa primeira fase, foram realizados ensaios em água ultrapura por BA μ E- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, por forma a selecionar o melhor sorvente para revestimento entre os vários materiais disponíveis, em condições experimentais padrão (extração: 25 mL (8,0 μ g/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μ LD: MeOH, 200 μ L, 30 min sob tratamento ultrassónico), de acordo com estudos anteriores [23, 25, 26].

Os ACs são materiais sólidos de natureza porosa, que retêm os analitos através de interações electrostáticas e/ou dispersivas, de acordo com as

propriedades texturais, área superficial e dimensão dos poros. Por outro lado, entre os polímeros testados, para além das propriedades físicas, vários mecanismos de interação podem ocorrer, nomeadamente de tipo π - π , dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio e interações iónicas [27].

Os Ps testados, em particular P1 a P6, retêm os analitos através de mecanismos múltiplos, isto é, por fase reversa, normal e simultaneamente por troca catiónica e/ou aniónica. O polímero P7, correspondente ao PDMS, através da bem estabelecida técnica de SBSE, foi usado por forma a comparar a seletividade e eficiência obtidas no estudo dos parabenos. É do conhecimento geral, que o PDMS é um sorvente de silicone especialmente dedicado a compostos com características apolares ($\log K_{OW} \geq 3$), promovendo mecanismos de interações hidrofóbicas (forças de *van-der-Waals*) com os compostos na forma neutra [27, 30].

A figura 8.2.a, mostra o perfil obtido para os sorventes poliméricos testados, onde é observado que o P1 e P5 apresentam as interações químicas mais fortes, alcançando melhor eficiência quando comparados com os restantes polímeros. O P3 e P4, apresentam eficiências razoáveis e semelhantes, sendo que a principal diferença seja observada para o MP quando comparado com P1 e P5; o P2 evidencia eficiências mais fracas, nomeadamente para o MP e EP. O polímero P6, é o que apresenta a eficiência mais baixa ($< 15\%$), tal como o P7 (SBSE(PDMS)), com eficiências menores que 20 % para os quatro parabenos. Uma vez os parabenos em estudo, apresentarem propriedades entre polares e semi-polares ($2,00 \leq \log K_{OW} \leq 3,47$), a eficiência obtida por SBSE(PDMS) é baixa, como seria de esperar. Dos resultados obtidos, P1 mostrou as interações químicas mais fortes entre os polímeros testados.

No caso dos ACs, as interações químicas entre os sorventes e os parabenos em estudo podem ser fortemente influenciadas pelo pH em solução, sendo determinante para o estado molecular dos parabenos, assim como para a carga à superfície dos ACs. Neste sentido, é de extrema importância o pH_{PZC} de cada AC, uma vez que dependendo do pH em solução, e das características ácidas, básicas ou neutras dos ACs, vão influenciar as interações electroestáticas e/ou dispersivas entre os ACs e os parabenos. Neste contexto,

para uma determinada solução na qual o pH é igual ao pH_{PZC}, a superfície do AC terá carga neutra, possuindo o mesmo número de cargas positivas e negativas. No caso do pH da amostra ser inferior ao pH_{PZC}, a carga superficial será positiva, e negativa se o pH da amostra for superior ao pH_{PZC} [20, 25, 26, 31, 32]. A pH 5,5, os quatro parabenos em estudo encontram-se presentes na forma neutra, enquanto AC2 possui carga negativa, AC1 apresenta um equilíbrio entre carga neutra e positiva, e AC3, AC4 e AC5 apresentam carga positiva.

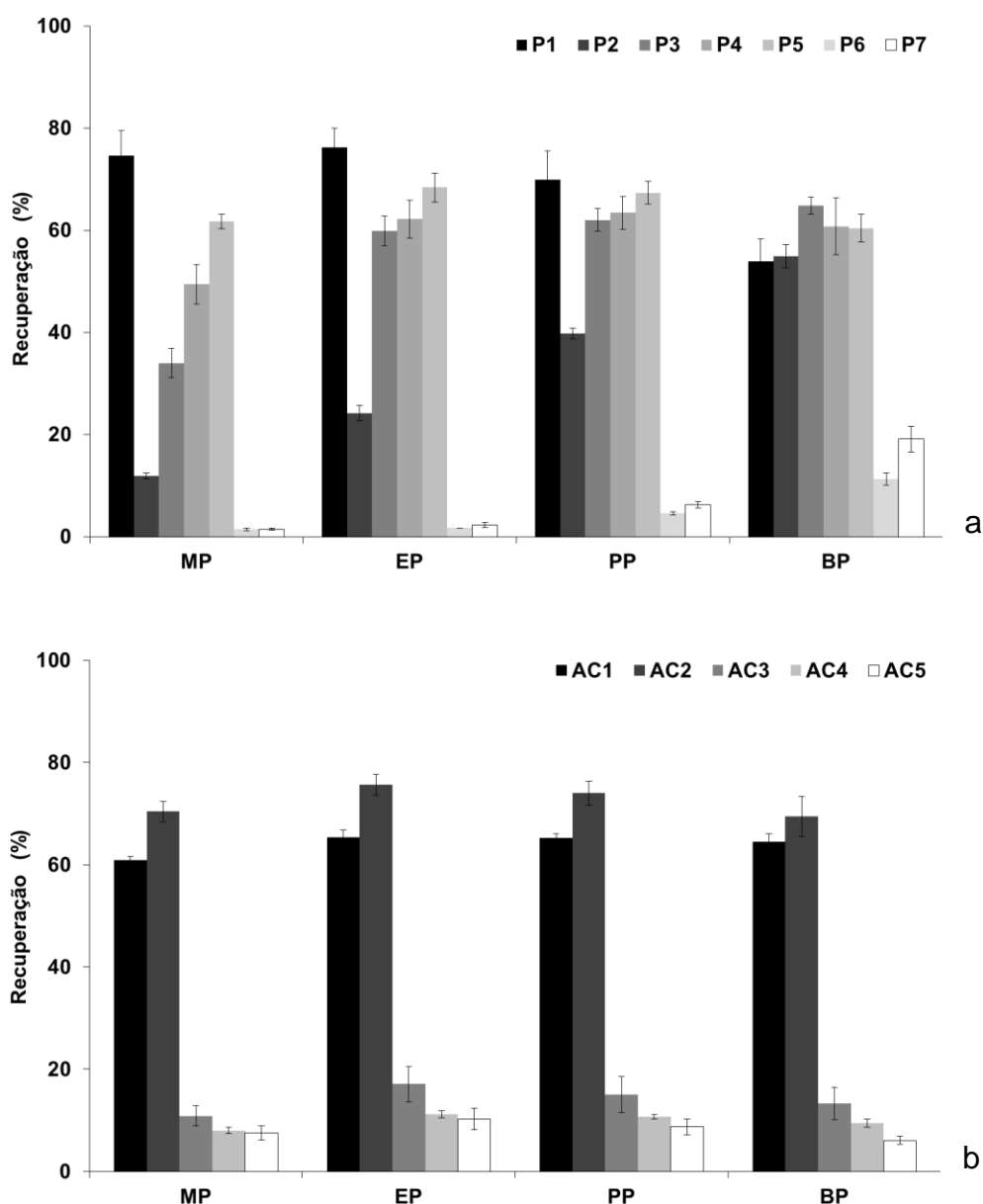


Figura 8.2 - Recuperação média obtida com diferentes Ps (a) e ACs (b) para os parabenos em estudo em água ultrapura por BA μ E- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, em condições experimentais padrão. Condições - extração: 25 mL (8,0 μ g/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μ LD: 200 μ L, MeOH, 30 min de tratamento ultrassônico.

A figura 8.2.b, mostra o perfil obtido para os ACs, onde se observa que os revestimentos AC1 e AC2 promovem a melhor eficiência, sendo que os restantes apresentam baixas recuperações (< 20 %), sob condições experimentais idênticas. Dos cinco ACs testados, AC1 e AC2 mostraram a melhor eficiência, sendo que as interações electroestáticas com os quatro parabenos são influenciadas, principalmente, pelo pH_{PZC} dos ACs. Uma vez que AC3, AC4 e AC5 apresentam características básicas, as interações destes com os parabenos são definitivamente influenciadas pelo pH_{PZC}. Pode igualmente afirmar-se, que as propriedades texturais adsorptivas dos ACs usados, parecem não ser decisivas para o processo de microextração.

Deste modo, entre todos os sorventes testados, selecionou-se o AC2 para ser usado como fase de revestimento na BA μ E para estudos posteriores, uma vez que evidenciou a eficiência média mais elevada (\approx 70-80 %) para os quatro parabenos em estudo.

8.2.4. Otimização da eficiência da BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)

Após seleccionar a melhor fase de revestimento para o enriquecimento dos quatro parabenos através de BA μ E, o passo seguinte consistiu na otimização de vários parâmetros que podem afetar a eficiência da microextração, por forma a obter máxima resposta analítica. Assim, estudos sistemáticos foram efetuados em água ultrapura fortificada (8,0 μ g/L), para otimizar os parâmetros mais importantes que podem afetar a eficiência da BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L). Deste modo, foram otimizados no passo de microextração, o tempo de equilíbrio, velocidade de agitação, pH, modificador orgânico e força iónica, e no passo da retroextração, o tipo de solvente e o tempo de retroextração, de acordo com estudos prévios [19-26].

8.2.4.1. Estudo do efeito dos parâmetros da μ LD(200 μ L)

Neste passo, começou por se avaliar o efeito do tipo de solvente e o tempo em ultrassons, por forma a se obterem as condições ideais que

promovem a libertação completa dos analitos do material de revestimento da BA μ E(AC2, 1,7 mg). A escolha do melhor solvente é de grande importância, uma vez que deve ter a força suficiente para uma rápida e completa remoção dos parabenos, bem como ser compatível com o sistema instrumental para análise [18, 23, 25-27]. Neste sentido, 200 μ L de ACN, MeOH e mistura de ACN/MeOH (1:1, v/v) foram testados, por forma a saber qual o solvente mais adequado. A figura 8.3, mostra o perfil obtido para os solventes testados, onde se verifica que a mistura ACN/MeOH (1:1, v/v) leva à melhor eficiência, tendo sido selecionada para o processo de retroextração em estudos posteriores.

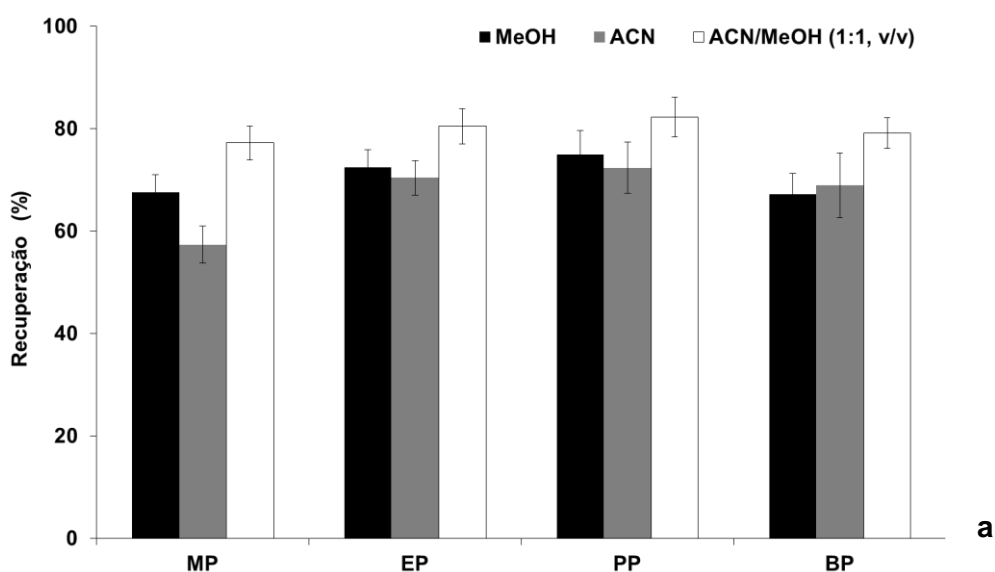


Figura 8.3 - Efeito do solvente na retroextração da BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD. Condições - extração: 25 mL (1,0 μ g/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μ LD: 200 μ L, 15 min de tratamento ultrassónico.

De seguida, o tempo de dessorção foi igualmente estudado para os períodos 15, 30, 45 e 60 min. Pelo perfil obtido para os tempos de retroextração estudados, a melhor eficiência foi obtida após 45 min (dados não apresentados). Para averiguar eventuais retenções na BA μ E(AC2, 1,7 mg) e/ou efeitos de memória ou *carryover*, foram efetuadas μ LD consecutivas das mesmas barras e injetadas no sistema de HPLC-DAD. Pelos resultados obtidos, o ruído existente foi sempre inferior aos LODs instrumentais.

Dos resultados obtidos, para estudos posteriores serão utilizados a mistura ACN/MeOH (1:1, v/v) sob 45 min de tratamento ultrassônico.

8.2.4.2. Estudo do efeito dos parâmetros da BA μ E(AC2, 1,7 mg)

Durante o processo de microextração, ocorre o equilíbrio entre os analitos, a fase sorvente e a matriz aquosa. Por forma a controlar todo o processo de enriquecimento, a velocidade de agitação e o tempo de equilíbrio possuem um papel fundamental, controlando a velocidade de transferência de massa entre as fases envolvidas, podendo limitar a eficiência do processo [23, 25-27]. Relativamente à velocidade de agitação, o perfil obtido para os ensaios efetuados a 750, 1000 e 1250 rpm à temperatura ambiente, mostrou uma pequena vantagem para as 1000 rpm, assim como menor precisão (dados não apresentados). Deste modo, 1000 rpm foi selecionado para estudos posteriores. De seguida, o tempo de equilíbrio foi igualmente estudado, o qual durante o enriquecimento através da tecnologia de amostragem por flutuação, a interação entre os analitos em solução e a fase de revestimento é baseado num processo de equilíbrio, o qual depende do tempo de exposição entre as partes envolvidas. Neste sentido, foram realizados ensaios para testar os tempos de 1, 2, 3 e 16 h à temperatura ambiente para os quatro parabenos em estudo. A figura 8.4.a, mostra o perfil obtido para os tempos de extração estudados, verificando-se um aumento gradual na recuperação média, tendo sido alcançada máxima eficiência para as 16 h de extração. Assim, o tempo de 16 h foi selecionado para estudos posteriores.

De seguida, o pH, a polaridade e força iónica da matriz foram igualmente estudados. Como já largamente referido, o pH da matriz é um parâmetro de extrema importância, uma vez poder influenciar a forma molecular dos analitos em solução e a carga superficial do material de revestimento para microextração, afetando diretamente a eficiência do processo [20, 21, 23, 25, 26]. No caso dos parabenos, encontram-se com carga predominantemente neutra para valores de pH até 6,0, ficando negativamente carregados pela perda de um protão para valores de pH superiores [29]. A figura 8.4.b, mostra o perfil de recuperações obtidas para o efeito do pH, onde são notórias recuperações semelhantes para

pH de 2,0 e 5,5. No entanto, para pH 8,0 a eficiência diminui ligeiramente para o MP e EP, enquanto para pH 11,0 diminui drasticamente para os quatro parabenos em estudo. Uma vez que AC2 possui características ácidas ($pH_{PZC} = 2,2$) e para $pH_{amostra} = 11,0$ a carga superficial de AC2 é negativa ($pH_{amostra} > pH_{PZC}$), a retenção dos quatro parabenos é electrostaticamente desfavorável, pelo facto de os mesmos estarem carregados negativamente como resultado da desprotonação a pH 11,0. Assim, o pH 5,5 foi seleccionado para prosseguir para estudos posteriores.

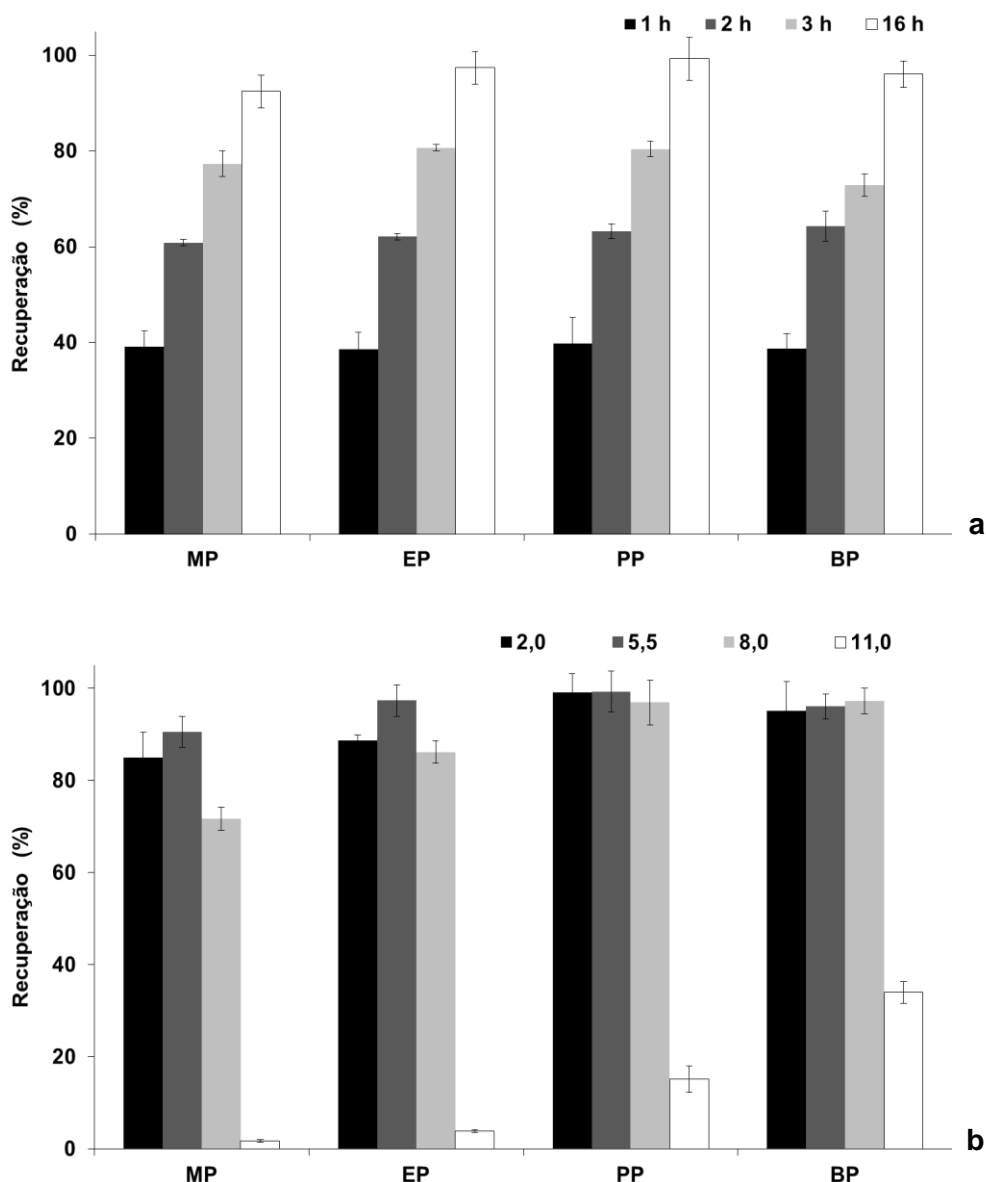


Figura 8.4 - Efeito do tempo de extração (a) e pH (b) na eficiência da BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD. Condições - (a) extração: 25 mL (8,0 μ g/L), 1000 rpm, pH 5,5; μ LD: 200 μ L, ACN/MeOH (1:1, v/v), 45 min de tratamento ultrassónico; (b) extração: 25 mL (8,0 μ g/L), 1000 rpm, 16 h; μ LD: 200 μ L, ACN/MeOH (1:1, v/v), 45 min de tratamento ultrassónico.

O estudo da força iônica com recurso à adição de um eletrólito, pode favorecer a migração dos compostos orgânicos em direção da fase sorvente, afetando a eficiência do processo, em particular para os composto polares ($\log K_{OW} < 3$). Duma forma geral, o aumento da recuperação dos analitos mais polares pela adição de sais, é conseguido devido ao efeito de *salting-out*, o qual é baseado na redução da solubilidade dos analitos, promovendo a migração dos mesmos para a fase sorvente [20, 23, 25, 26, 33]. Neste sentido, foram realizados ensaios com adição de NaCl contendo percentagens de 0, 5, 10 e 15 % (p/v) em água ultrapura à temperatura ambiente, onde se verifica que não há vantagem na adição de um eletrólito na eficiência média do processo de microextração, a qual é fortemente reduzida para o MP e EP, e ligeiramente para o PP e BP (dados não apresentados).

O último parâmetro a ser estudado foi a polaridade da matriz, a qual pode ser alterada ou controlada pela adição dum solvente orgânico, o qual elimina ou reduz o efeito de *wall-effect*. Este fenómeno baseia-se na adsorção dos compostos com características mais hidrofóbicas nas paredes de vidro dos frascos de amostragem, o que pode reduzir a eficiência do processo de microextração [21, 23, 34]. Assim, foram realizados ensaios com a adição de MeOH contendo percentagens de 0, 5, 10 e 15 % (v/v) em água ultrapura e à temperatura ambiente. Por observação do perfil de dados obtidos, verifica-se uma redução gradual e acentuada na eficiência média para o MP e EP, uma redução ligeira e gradual para o PP, enquanto para o BP as diferenças são negligenciáveis (dados não apresentados). Deste modo, para estudos posteriores, a metodologia proposta será desenvolvida sem a adição de NaCl e MeOH.

8.2.5. Validação da metodologia BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD

Após otimizados os parâmetros que podem afetar o desempenho analítico da metodologia BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, estabeleceram-se as condições experimentais ótimas para prosseguir para a validação do método, usando as seguintes condições - BA μ E(AC2): 25 mL, 1000 rpm, 16 h, pH 5,5; μ LD: ACN/MeOH (1:1, v/v), 200 μ L, 45 min de tratamento ultrassónico. Para

avaliar a eficiência da metodologia proposta, foram realizados ensaios em 25 mL de água ultrapura fortificada (8,0 μ g/L), onde se obtiveram eficiências desde 85,6 \pm 6,3 % (MP) a 100,6 \pm 11,8 % nas condições experimentais otimizadas. A sensibilidade da metodologia proposta, foi estudada através da determinação dos limiares analíticos, tendo-se alcançado 0,1 μ g/L para os LODs e 0,3 μ g/L para os LOQs, determinados através da razão S/N igual a 3 e 10, respetivamente. A calibração da metodologia BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD foi efetuada em água ultrapura, numa gama de concentrações compreendida entre 0,5 e 28,0 μ g/L, na qual se obteve boa linearidade com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9982 e precisões inferiores a 12,1 % (RSD; 20,0 μ g/L, MP). A tabela 8.2(A), resume a recuperação experimental obtida, o coeficiente de determinação (r^2) e a equação da calibração, para a metodologia BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

Tabela 8.2 - Recuperação média, coeficiente de determinação e equação da calibração obtidos para os parabenos em estudo, através do método BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

| Parabenos | A | | | B | | |
|-----------|---|-----------|-------------------|---|-----------|--------------------|
| | BA μ E (AC2, 1,7 mg) | | | BA μ E (AC2, 0,9 mg) | | |
| | Recuperação ^a (% \pm RSD) | $r^{2,b}$ | Equação da reta | Recuperação ^a (% \pm RSD) | $r^{2,b}$ | Equação da reta |
| MP | 85,6 \pm 6,3 | 0,9982 | y=12,5x \pm 7,2 | 84,7 \pm 9,8 | 0,9955 | y=10,9x \pm 11,8 |
| EP | 94,0 \pm 7,1 | 0,9993 | y=14,6x \pm 2,9 | 91,8 \pm 2,8 | 0,9989 | y=13,2x \pm 4,4 |
| PP | 97,5 \pm 6,3 | 0,9996 | y=15,0x \pm 3,2 | 93,8 \pm 2,7 | 0,9986 | y=14,7x \pm 4,3 |
| BP | 100,6 \pm 11,8 | 0,9988 | y=16,5x \pm 1,8 | 93,3 \pm 11,1 | 0,9984 | y=15,4x \pm 3,2 |

^a Ensaios a 8,0 μ g/L, n = 3;

^b Nove níveis de concentração desde 0,5 a 28,0 μ g/L.

A figura 8.5, mostra um cromatograma relativo a um ensaio de recuperação em água ultrapura fortificada (8,0 μ g/L) através de BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas, onde é observada boa resolução.

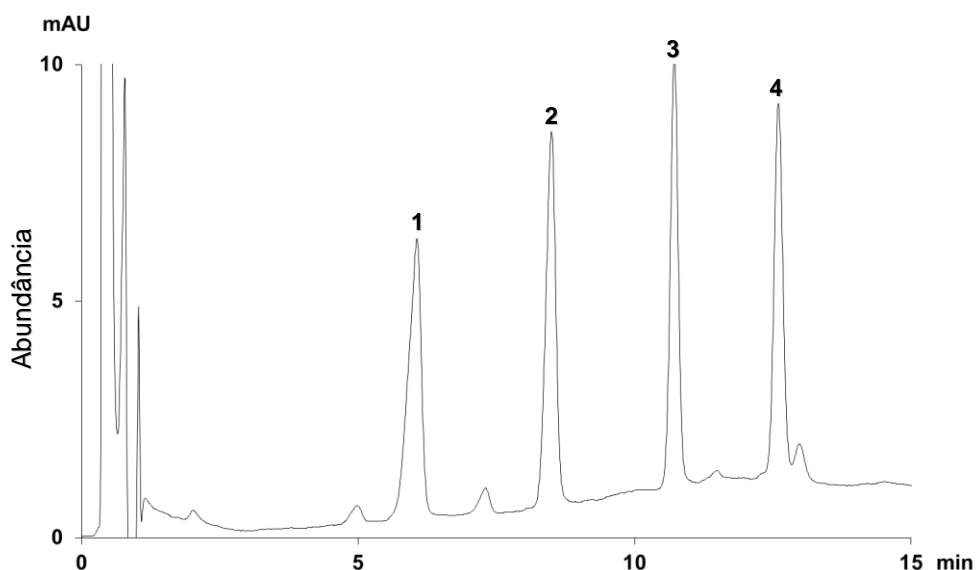


Figura 8.5 - Cromatograma referente a ensaio de recuperação a 8,0 μ g/L obtido por BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-MP, 2-EP, 3-PP, 4-BP.

A repetibilidade foi igualmente avaliada, com ensaios efetuados no mesmo dia (três ensaios) e em três dias diferentes (nove ensaios), para a metodologia proposta, calculados recorrendo ao RSD. Assim, para o efeito foram realizados ensaios em triplicado em água ultrapura, para níveis de 1,0, 4,0 e 16,0 μ g/L no mesmo dia, e para o nível de 8,0 μ g/L em três dias diferentes, estando todos os resultados alcançados apresentados na tabela 8.3.

No que respeita à eficiência média obtida nos ensaios de repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes, por comparação verificou-se boa concordância para os quatro parabenos em estudo. Relativamente às precisões obtidas para a repetibilidade no mesmo dia, obtiveram-se bons resultados, abrangendo desde 3,1 % (RSD; BP, 16,0 μ g/L) a 10,2 % (RSD; MP, 4,0 μ g/L), e para a repetibilidade em dias diferentes demonstrou, igualmente, bons resultados com precisões inferiores a 10,0 % (BP), através de BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD. Ao comparar os resultados obtidos através da metodologia proposta com outras técnicas de microextração estática, nomeadamente SBSE-TD/GC-MS incluindo passos de derivatização [8, 17], são obtidas melhores recuperações pela metodologia proposta no presente estudo, em particular para o MP e EP. É de salientar igualmente, que os passos de derivatização são

sempre indesejáveis, uma vez levarem à introdução de interferentes nos sistemas analíticos, assim como no aumento considerável da execução experimental. Todavia, a sensibilidade analítica da metodologia proposta BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, pode ser melhorada usando o sistema de HPLC acoplado a espectrometria de massa ou sistemas *tandem* (LC-MS ou LC-MS/MS), reduzindo consideravelmente os LODs e sendo importante na identificação inequívoca dos analitos em estudo, em particular no estudo de matrizes de complexidade elevada.

Além dos excelentes resultados obtidos pelo método proposto BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, outro objetivo do presente estudo era o de testar o desempenho e capacidade analítica do dispositivo de microextração com metade do tamanho, BA μ E(AC2, 0,9 mg), contendo metade do material de revestimento, sob as condições experimentais otimizadas, tal como já havia sido proposto em estudos anteriores [26]. Perante os resultados obtidos, os quais estão presentes na tabela 8.2(B), foram obtidas recuperações semelhantes, coeficientes de determinação superiores a 0,9955 na mesma gama de concentrações, e iguais limiares analíticos, com LODs de 0,1 μ g/L e LOQs de 0,3 μ g/L, calculados através da razão S/N igual a 3 e 10, respetivamente. Foram ainda efetuados ensaios para avaliar a repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes, para BA μ E(AC2, 0,9 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, onde se verificaram diferenças não significativas, no que respeita às recuperações e precisões, entre BA μ E(AC2, 1,7 mg) e BA μ E(AC2, 0,9 mg), tal como mostra a tabela 8.3.

Pelos dados obtidos, as diferenças observadas mostram que a quantidade de fase AC2 para revestimento do dispositivo de microextração, não influencia a eficiência da extração de BA μ E durante o processo de enriquecimento dos quatro parabenos em estudo, estando assim abaixo da saturação da fase AC2. Deste modo, a redução do dispositivo de microextração para metade, pode ser uma vantagem a considerar, nomeadamente quando a quantidade de amostra é limitada, e ainda na redução na quantidade de materiais necessários na sua conceção, assim como na possibilidade da redução do volume de solvente a usar na retroextração, sem comprometer a libertação completa dos analitos da fase sorvente durante essa etapa.

Tabela 8.3 - Recuperações médias e precisões (% ± RSD), obtidas nos ensaios de repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes por BAμE(AC2) seguida por μLD(200 μL)/HPLC-DAD para os quatro parabenos em estudo, sob condições experimentais otimizadas.

| BAμE (AC2, 1,7 mg) | | | | |
|--------------------|-----------------------------|-------------|-------------|--|
| Parabenos | Repetibilidade ^a | | | Repetibilidade em dias diferentes ^b |
| | 1,0 μg/L | 4,0 μg/L | 16,0 μg/L | 8,0 μg/L |
| | Recuperação (% ± RSD) | | | |
| MP | 93,5 ± 9,1 | 82,1 ± 10,2 | 82,4 ± 5,6 | 83,6 ± 8,1 |
| EP | 95,1 ± 7,9 | 87,9 ± 9,1 | 93,4 ± 10,0 | 92,3 ± 7,3 |
| PP | 87,2 ± 6,8 | 92,5 ± 3,2 | 94,7 ± 7,8 | 96,4 ± 8,5 |
| BP | 95,2 ± 3,9 | 96,1 ± 7,1 | 100,8 ± 3,1 | 97,5 ± 10,0 |

| BAμE (AC2, 0,9 mg) | | | | |
|--------------------|-----------------------------|-------------|--------------|--|
| Parabenos | Repetibilidade ^a | | | Repetibilidade em dias diferentes ^b |
| | 1,0 μg/L | 4,0 μg/L | 16,0 μg/L | 8,0 μg/L |
| | Recuperação (% ± RSD) | | | |
| MP | 88,5 ± 9,8 | 88,4 ± 6,2 | 77,4 ± 10,6 | 82,9 ± 7,1 |
| EP | 85,7 ± 4,8 | 92,2 ± 10,1 | 85,2 ± 6,9 | 89,2 ± 7,1 |
| PP | 99,9 ± 11,8 | 98,4 ± 9,3 | 99,3 ± 9,3 | 97,2 ± 11,8 |
| BP | 89,3 ± 7,0 | 103,1 ± 3,2 | 100,4 ± 10,5 | 95,9 ± 12,9 |

^a n=3;

^b n=9 em três dias consecutivos.

Em resumo, a metodologia BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/HPLC-DAD desenvolvida, que opera através da tecnologia de amostragem por flutuação, mostrou bom desempenho analítico, tendo-se alcançado boa eficiência e repetibilidade, mesmo quando o dispositivo é reduzido para metade.

8.2.6. Aplicação da metodologia BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/HPLC-DAD a matrizes reais

A aplicação da presente metodologia em matrizes reais, é um passo necessário por forma a demonstrar a capacidade analítica da metodologia

BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD. Deste modo, a metodologia proposta que opera em modo de amostragem por flutuação, foi aplicada em matrizes diversas, nomeadamente água da torneira, subterrânea, estuarina e piscina, assim como a produtos cosméticos e urina. Dado que na maioria das matrizes reais a complexidade é elevada, recorre-se usualmente ao SAM de modo a minimizar os efeitos existentes nas mesmas, sendo igualmente adequada para efeitos de quantificação dos quatro parabenos em estudo e a melhor estratégia analítica para o efeito [27]. Neste sentido, foram efetuados ensaios através de BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD usando a metodologia SAM, onde as amostras reais foram fortificadas com quatro níveis de concentração desde 4,0 a 16,0 μ g/L constituídos pela mistura dos quatro parabenos, efetuando igualmente o ensaio em branco sem qualquer fortificação (C_0). A tabela 8.4 resume os resultados obtidos pelo SAM nas matrizes reais estudadas, sob condições experimentais otimizadas. Pelos resultados obtidos, observa-se boa linearidade com r^2 superior a 0,9936 (EP), não tendo sido detetados vestígios de qualquer dos quatro parabenos nas amostras de água potável, subterrânea e estuarina. No entanto, na água de piscina foi detetado PP com um nível de $0,9 \pm 0,1$ μ g/L. A presença de parabenos em águas sujeitas a tratamento com cloro é considerada problemática, uma vez que este reage com os parabenos formando derivados destes que apresentam maior toxicidade [7, 35]. Relativamente às águas residuais, foram detetados alguns dos parabenos estudados, os quais estão compreendidos entre $0,4 \pm 0,1$ μ g/L (MP) e $1,1 \pm 0,1$ μ g/L (BP) na água residual #1, e $0,7 \pm 0,1$ μ g/L (BP) na água residual #2; na água residual #3 não foi detetado nenhum dos parabenos em estudo. De acordo com os níveis detetados, os parabenos foram detetados na água residual bruta antes da decantação primária (residual #1), e depois da mesma (residual #2). Na água residual #3, respetiva ao tratamento UV/vis, os níveis de parabenos foram inferiores aos LODs determinados. Posteriormente, a presente metodologia foi aplicada na análise de parabenos na forma molecular em amostras de urina, através do SAM. Assim, dos resultados obtidos, detetou-se a presença do MP com $27,7 \pm 2,0$ μ g/L e do EP com $6,4 \pm 0,5$ μ g/L. Enquanto os parabenos que estão presentes em produtos que são ingeridos na forma oral, são metabolizados na sua maioria no ácido *p*-hidroxibenzóico e na forma conjugada (glucorados e sulfatados), sendo excretados via urina, os parabenos presentes

em produtos comerciais para serem aplicados na pele, são excretados também na urina, mas na forma molecular e conjugada (glucorada e sulfatada) [36].

Tabela 8.4 - Coeficientes de determinação (r^2) obtidos e níveis detetados (C_0) para os quatro parabenos através do SAM nas matrizes reais estudadas, pelo método BAμE(AC2, 1,7 mg)-μLD(200 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

| Parabenos | MP | | EP | | PP | | BP | |
|------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|--------------------|
| | r^2 | C_0 (μg/L±DP) | r^2 | C_0 (μg/L±DP) | r^2 | C_0 (μg/L±DP) | r^2 | C_0 (μg/L±DP) |
| Água torneira | 0,9984 | < LOD | 0,9950 | < LOD | 0,9993 | < LOD | 0,9992 | < LOD |
| Água subterrânea | 0,9953 | < LOD | 0,9994 | < LOD | 0,9995 | < LOD | 0,9992 | < LOD |
| Água estuarina | 0,9956 | < LOD | 0,9979 | < LOD | 0,9989 | < LOD | 0,9985 | < LOD |
| Água piscina | 0,9986 | < LOD | 0,9980 | < LOD | 0,9985 | 0,9±0,1 | 0,9996 | < LOD |
| Água residual #1 | 0,9988 | 0,4±0,1 | 0,9936 | < LOQ | 0,9982 | 0,5±0,1 | 0,9986 | 1,1±0,1 |
| Água residual #2 | 0,9947 | < LOD | 0,9970 | < LOD | 0,9947 | < LOD | 0,9988 | 0,7±0,1 |
| Água residual #3 | 0,9975 | < LOD | 0,9962 | < LOD | 0,9994 | < LOD | 0,9995 | < LOD |
| Urina | 0,9956 | 27,7±2,0 | 0,9946 | 6,4±0,5 | 0,9991 | < LOD | 0,9974 | < LOD |
| Leite corporal | 0,9991 | 23,8±1,7 | 0,9963 | < LOD | 0,9992 | 5,6±0,4 | 0,9957 | < LOD |
| Creme mãos | 0,9988 | 17,9±1,3 | 0,9993 | 2,9±0,3 | 0,9997 | 1,9±0,1 | 0,9989 | 1,6±0,1 |

C_0 : Concentração detetada na amostra.

Assim, os níveis determinados na amostra de urina, sugerem que o dador voluntário de urina, usou produtos cosméticos que contêm parabenos para aplicação na pele. Por fim, foram analisadas produtos cosméticos, nomeadamente loção corporal e creme de mãos. No caso da loção corporal, das análises efetuadas foram detetados MP e PP com níveis de $23,8 \pm 1,7$ e $5,6 \pm 0,4$ μg/L, respetivamente. Para o creme de mãos, foram detetados todos os parabenos estudados, com níveis de $17,9 \pm 1,3$ μg/L para o MP, $2,9 \pm 0,3$ μg/L

para o EP, $1,9 \pm 0,1$ $\mu\text{g/L}$ para o PP e $1,6 \pm 0,1$ $\mu\text{g/L}$ para o BP. Ao convertermos os níveis de parabenos detetados nos produtos cosméticos para percentagem em cada amostra, estes são expressos em proporção ao ácido *p*-hidroxibenzóico, correspondendo a 0,4 % em MP (4,8 mg/g_{creme}) e 0,1 % em PP (mg/g_{creme}) para a loção corporal, e de 0,3 % em MP (3,7 mg/g_{creme}), 0,1 % em EP (0,6 mg/g_{creme}), 0,03 % em PP (0,4 mg/g_{creme}) e 0,02% em BP (0,3 mg/g_{creme}) para o creme de mãos. A figura 8.6, mostra a sobreposição de dois cromatogramas obtidos das amostras de loção corporal e creme de mãos por BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

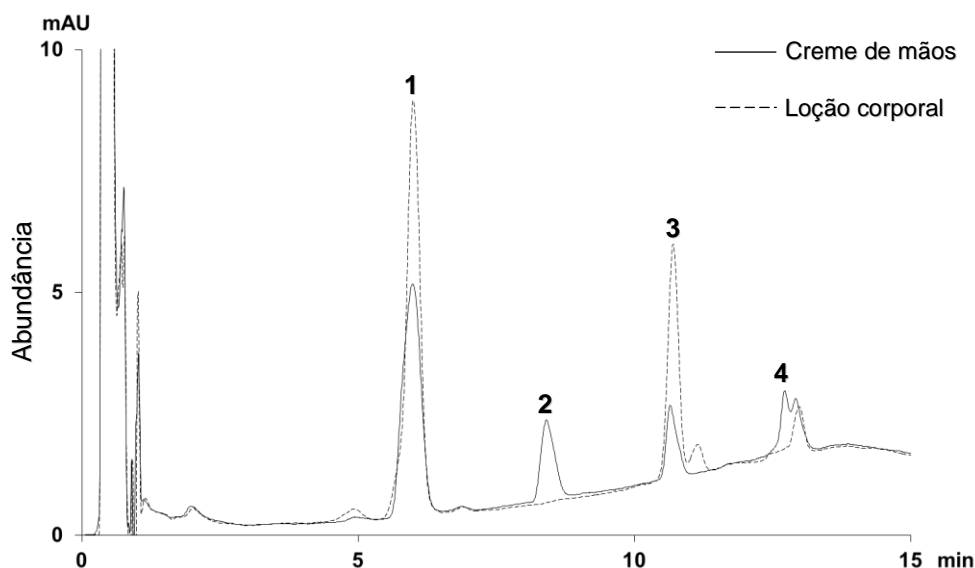


Figura 8.6 - Cromatograma referente à sobreposição dos ensaios efetuados ao creme de mãos e loção corporal, obtido pelo SAM por BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-MP, 2-EP, 3-PP, 4-BP.

Tal como descrito na diretiva da EU (JO da UE, nº 1223/2009, L342/59), os níveis máximos recomendados de parabenos em produtos farmacêuticos de higiene e cuidado pessoal, são de 0,4 % (p/p) para cada parabeno, e 0,8 % (p/p) para a soma de todos os parabenos presentes, expressos em proporção ao ácido *p*-hidroxibenzóico. Para ambos os produtos cosméticos, os níveis detetados encontram-se dentro dos limites recomendados, sendo de realçar que o MP na loção corporal esteja presente no limite.

8.3. CONCLUSÕES

No presente estudo, a metodologia proposta BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD, usando um AC seletivo como fase de revestimento, foi desenvolvida, otimizada e validada para a monitorização simultânea de quatro parabenos em matrizes reais. Nas condições experimentais otimizadas, obteve-se excelente desempenho analítico, incluindo boa eficiência, precisão adequada, limites analíticos ao nível dos ppb's e boa gama linear dinâmica.

A aplicação da metodologia em matrizes reais, nomeadamente águas, biológicas e produtos cosméticos comerciais, mostrou ser de fácil execução, eficiente, e amiga do ambiente, obtendo-se boa seletividade, sensibilidade e bom desempenho analítico com recurso ao SAM.

A presente metodologia (BA μ E(AC2, 1,7 mg)- μ LD(200 μ L)/HPLC-DAD) que opera sob tecnologia de amostragem por flutuação, demonstrou ser uma excelente alternativa para a análise de quatro parabenos, sendo possível selecionar a fase sorvente mais adequada aos analitos em estudo, quando outras técnicas sortivas que operam no modo estático apresentam baixa eficiência. A redução do dispositivo de microextração não compromete a eficiência analítica da técnica BA μ E.

8.4. REFERÊNCIAS

1. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A* 1348 (2014) 17-26.
2. Yamamoto, H.; Tamura, I.; Hirata, Y.; Kato, J.; Kagota, K.; Katsuki, S.; Yamamoto, A.; Kagami, Y.; Tatarazako, N.; Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach. *Science of the Total Environment* 410-411 (2011) 102-111.
3. González-Mariño, I.; Quintana, J. B.; Rodríguez, I.; Cela, R.; Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate-mass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Water Research* 45 (2011) 6770-6780.

4. Boberg, J.; Taxvig, C.; Christiansen, S.; Hass, U.; Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology* 30 (2010) 301-312.
5. Vela-Soria, F.; Ballesteros, O.; Zafra-Gómez, A.; UHPLC–MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (2014) 3773-3785.
6. Błędzka, D.; Gromadzińska, J.; Wąsowicz, W.; Parabens. From environmental studies to human health. *Environment International* 67 (2014) 27-42.
7. Terasaki, M.; Takemura, Y.; Makino, M.; Paraben-chlorinated derivatives in river waters. *Environmental Chemistry Letters* 10 (2012) 401-406.
8. Ramírez, N.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; Simultaneous determination of parabéns and synthetic in water by stir-bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 35 (2012) 580-588.
9. Gracia-Lor, E.; Martínez, M.; Sancho, J. V.; Peñuela, G.; Hernández, F.; Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 99 (2012) 1011-1023.
10. Martín, J.; Camacho-Muñoz, D.; Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E.; Determination of emerging and priority industrial pollutants in surface water and wastewater by liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (2014) 3709-3716.
11. Gorga, M.; Petrovic, M.; Barceló, D.; Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1295 (2013) 57-66.
12. Yang, T.-J.; Tsai, F.-J.; Chen, C.-Y.; Yang, T. C.-C.; Lee, M.-R.; Determination of additives in cosmetics by supercritical fluid extraction on-line headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 668 (2010) 188-194.
13. Regueiro, J.; Becerril, E.; Garcia-Jares, C.; Llompart, M.; Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 4693-4702.
14. Tsai, T.-F.; Lee, M.-R.; Determination of antioxidants and preservatives in cosmetics by SPME combined with GC-MS. *Chromatographia* 67 (2008) 425-431.

15. Ramírez, N.; Marcé, R. M.; Borrull, F.; Determination of parabens in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6226-6231.
16. Ferreira, A. M. C.; Möder, M.; Laespada, M. E. F.; Stir bar sorptive extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soil, sediment and sludge with in situ derivatization and determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 3837-3844.
17. Ferreira, A. M. C.; Möder, M.; Laespada, M. E. F.; GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by in situ derivatisation and stir-bar sorptive extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (2011) 945-953.
18. Neng, N. R.; Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; Adsorptive micro-extraction techniques-Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7303-7310.
19. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) with in situ derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 3155-3163.
20. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices. *Talanta* 83 (2011) 1643-1649.
21. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibric acid in environmental and biological matrices. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6263-6270.
22. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 1355-1364.
23. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction-Application to trace level analysis of fungicides in real matrices, *Journal of Chromatography A* 1265 (2012) 7-16.
24. Gonçalves, A. F. P.; Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Development of a Powdered Activated Carbon in Bar Adsorptive MicroExtraction for the Analysis of Morphine and Codeine in Human Urine. *Journal of Chromatographic Science* 50 (2012) 574-581.

25. Almeida, C.; Stępkowska, A.; Alegre, A.; Nogueira, J. M. F.; Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A*, 1311 (2013) 1-10.
26. Almeida, C.; Strzelczyk, R.; Nogueira, J. M. F.; Improvements on bar adsorptive microextraction (BAμE) technique-Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices. *Talanta* 120 (2014) 126-134.
27. Nogueira, J. M. F.; Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta* 757 (2012) 1-10.
28. US EPA, Estimation Programs Interface Suite TM for Microsoft® Windows, v. 4.1, United States Environmental Protection Agency, Washington DC, 2011.
29. Hilal, S. H.; Karickhoff, S. W.; Carreira, L. A.; A Rigorous Test for SPARC's Chemical Reactivity Models: Estimation of More Than 4300 Ionization pK_as Quantitative Structure-Activity Relationships 14 (1995) 348-355.
30. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.; Stir Bar Sorptive extraction (SBSE) a novel Extraction Technique for aqueous samples: Theory and Principles. *Journal of Microcolumn Separations* 11 (1999) 737-747.
31. Mestre, A. S.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Parra, J. B.; Carvalho, A. P.; Ania, C. O.; Waste-derived activated carbons for removal of ibuprofen from solution: Role of surface chemistry and pore structure. *Bioresource Technology* 100 (2009) 1720-1726.
32. Mestre, A. S.; Pinto, M. L.; Pires, J.; Nogueira, J. M. F.; Carvalho, A. P.; Effect of solution pH on the removal of clofibric acid by cork-based activated carbons. *Carbon* 48 (2010) 972-980.
33. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 1303-1311.
34. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. *Analytical Chimica Acta* 517 (2004) 21-32.
35. Alvarez-Rivera, G.; Llompart, M.; Garcia-Jares, C.; Lores, M.; Identification of halogenated photoproducts generated after ultraviolet-irradiation of parabens and benzoates in water containing chlorine by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1349 (2014) 105-115.

36. Frederiksen, H.; Jørgensen, N.; Andersson, A.-M.; Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 21 (2011) 262-271.

CAPÍTULO 9

AVANÇOS NA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA EM BARRA – APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM MATRIZES REAIS [1]

9.1. NOTA INTRODUTÓRIA

Uma vez atualmente o uso de produtos de uso farmacêutico ser elevado, a presença de químicos usados como substâncias ativas no ambiente tem sido muito relatada, o que tem levado a uma grande preocupação por parte da comunidade científica. De um modo geral, as substâncias farmacêuticas são libertadas para o meio ambiente na forma molecular ou metabolizada. Entre algumas fontes, incluem-se o uso doméstico, ETARs, hospitais, unidades industriais e atividades veterinárias. Os fármacos em geral apresentam características polares, o que facilita a sua entrada no ambiente aquático [2-4]. Os anti-inflamatórios não-esteroides (NSAID) em particular, são uma das maiores classes de fármacos usados a nível mundial, uma vez que possuem atividade de largo espectro, nomeadamente como analgésico, antipirético e/ou anti-inflamatório. Entre estas substâncias, incluem-se o cetoprofeno (KET), naproxeno (NAP), diclofenaco (DIC) e ácido mefenâmico (MEF) [5]. As substâncias com propriedades diuréticas estão incluídas noutra classe usada em grande escala para o tratamento clínico de problemas cardíacos, hipertensão e *edema*, mas igualmente usada para *doping*, em particular a furosemida (FUR), apesar de ser proibido em atividades desportivas [6]. Outra substância igualmente usada, é a mebeverina (MEB), a qual possui propriedades anti-convulsivas a nível muscular, atuando no sistema gastro-intestinal em doenças como a síndrome de *Bowel*, especialmente eficiente para espasmos do cólon [7]. Presentemente, não são totalmente conhecidos os efeitos negativos que estas substâncias podem ter no ambiente, tendo os efeitos de desregulação endócrina e resistências bacteriana sido já identificados. Quando a eficiência de eliminação de fármacos nas ETARs é reduzida, a presença no ambiente pode levar a problemas de dimensão superior [2, 5, 8]. Igualmente preocupantes, são todas as terapias clínicas, abuso de fármacos, casos forenses e *doping* desportivo, devido aos efeitos nocivos que podem induzir nos humanos [9, 10]. Perante estes factos, são necessárias novas metodologias analíticas para a análise de amostras de água e biológicas, nomeadamente a urina. Sendo que concentrações ao nível de traços ou residual, podem ser encontradas em diversas matrizes reais, as estratégias analíticas normalmente adotadas, incluem

técnicas de enriquecimento prévios à análise por GC, HPLC ou acopladas a MS (GC-MS ou LC-MS) [4, 5, 9, 10].

Na última década, os métodos sortivos foram genericamente as técnicas adotadas como métodos para enriquecimento, nas quais a SPE [11-14], a SPME [15-17] e a SBSE [5, 18] têm sido propostas para a análise de substâncias farmacêuticas em matrizes reais. A SBSE em particular usando polidimetilsiloxano (PDMS), apresenta limitações na microextração de analitos polares e semi-polares [5, 19]. Recentemente, foram introduzidos poliuretanos (PU) como fases de revestimento para enriquecimento por SBSE, tendo sido comparada com a SBSE(PDMS) para a análise de fármacos em amostras reais [5]. Apesar da SBSE(PU) ter demonstrado melhor seletividade quando comparada com a SBSE(PDMS), mostrou baixa eficiência para alguns compostos em particular.

Neste contexto, a BA μ E apresenta-se como um dispositivo para enriquecimento no modo estático [20], tendo já demonstrado bom desempenho analítico na análise de fármacos [4, 24] e excelente alternativa a outras técnicas sortivas (SBSE(PDMS), [26]), nomeadamente para a análise de outros compostos polares e/ou semi-polares em matrizes reais de diverso tipo [4, 21-24, 25]. Recentemente foram introduzidos melhoramentos no processo analítico, através da redução do volume de solvente necessário na retroextração, efetuada num único passo, assim como a redução simultânea do dispositivo analítico [23]. Estes novos aperfeiçoamentos, permitiram uma execução experimental ainda mais rápida, mais simples e ambientalmente mais favorável [23, 25].

O presente estudo, tem como objetivo a aplicação destes novos conceitos, usando o dispositivo BA μ E com metade do tamanho revestido com fases sorventes adequadas, com redução ainda maior do volume de solvente para retroextração (200 μ L \rightarrow 100 μ L), seguida da análise por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por rede de díodos (BA μ E- μ LD/HPLC-DAD) na determinação de seis fármacos (furosemida, mebeverina, cetoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ácido mefenâmico) em matrizes reais. A figura 9.1 ilustra as estruturas químicas dos compostos modelo selecionados para o presente estudo. A otimização da presente metodologia, incluindo a comparação

de vários sorventes (cinco ACs e cinco Ps) e respectivas interações químicas, assim como a influência de diversos parâmetros experimentais é totalmente avaliada e discutida. A metodologia otimizada é igualmente validada e aplicada na determinação dos seis fármacos em amostras de água e urina.

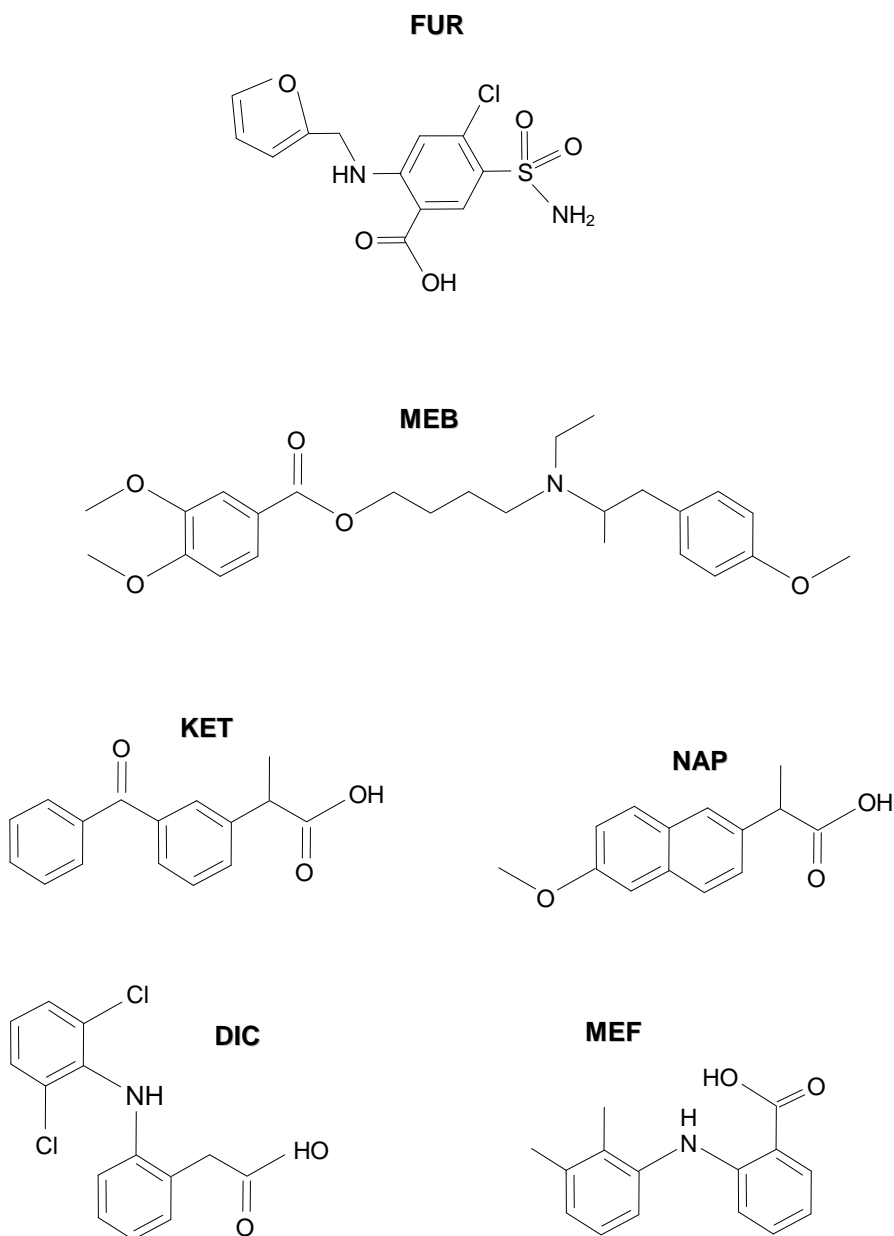


Figura 9.1 - Estruturas químicas dos seis compostos farmacêuticos selecionados para o presente estudo.

9.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.2.1. Condições de operação instrumental

No presente estudo, seis fármacos (FUR, MEB, KET, NAP, DIC e MEF) foram selecionados como compostos modelo para o presente estudo (figura 9.1). Numa primeira fase, para obter as melhores condições de operação instrumental para os compostos farmacêuticos selecionados, começou por se injetar os padrões individuais para determinar o tempo de retenção, espectro de absorção UV/vis, seletividade e resolução, sendo que posteriormente se injetaram os correspondentes padrões mistura. De acordo com os dados obtidos, selecionaram-se os comprimentos de onda de 222, 230, 258 e 275 nm, uma vez que correspondem ao máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) dos compostos modelo em estudo. A fase móvel era constituída por água com 0,1 % em H_3PO_4 (60 %) e MeOH (40 %) usando-se uma coluna cromatográfica convencional de fase reversa (25 °C), permitindo obter resposta instrumental adequada no que respeita à seletividade, resolução e em tempo analítico aceitável (< 18 min).

Posteriormente, a sensibilidade instrumental foi determinada por intermédio dos LODs e LOQs, pela injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos, determinados através de S/N igual a 3 e 10, respetivamente. Neste sentido, obtiveram-se valores para os LODs compreendidos entre 3,0 e 15,0 $\mu\text{g/L}$ e, para os LOQs, entre 10,0 e 50,0 $\mu\text{g/L}$, para os seis fármacos em estudo. De seguida, a calibração instrumental foi efetuada com recurso à injeção de padrões de calibração constituídos pelos seis compostos em estudo, abrangendo concentrações desde 20,0 a 2000,0 $\mu\text{g/L}$, com um total de doze níveis de concentração. Na gama estudada, obtiveram-se boas linearidades para os seis fármacos, com coeficientes de determinação superiores a 0,9978 (MEB). Da mesma forma, a precisão instrumental foi avaliada através da injeção consecutiva dos padrões de calibração, o que mostrou valores inferiores a 5,2 % (DIC, 50 $\mu\text{g/L}$), expressos em RSD. A injeção de solvente isento dos analitos em estudo, mostrou que não existiram efeitos de memória. Na tabela 9.1, resumem-se as características dos analitos em estudo, nomeadamente $\log K_{\text{O/W}}$ e pK_{a} , assim como todos os dados instrumentais obtidos por HPLC-DAD, para os seis fármacos em estudo, sob condições instrumentais otimizadas.

Tabela 9.1 - Tipo de compostos, $\log K_{OW}$, pK_a , tempos de retenção (t_R), comprimento de onda máximo ($\lambda_{m\acute{a}x}$), limiares analíticos (LODs e LOQs) e coeficientes de determinação (r^2) para os seis fármacos em estudo obtidos por HPLC-DAD, sob condições instrumentais otimizadas.

| Fármacos | Tipo | $\log K_{OW}^a$ | pK_a^b | t_R (min) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) | LODs ($\mu\text{g/L}$) | LOQs ($\mu\text{g/L}$) | $r^{2,c}$ |
|----------|------------------|-----------------|------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|
| FUR | Diurético | 2,32 | 3,18/10,07 | 7,6 | 230 | 6,0 | 20,0 | 0,9996 |
| MEB | Anti-espasmódico | 3,82 | 10,09 | 8,7 | 222 | 10,0 | 33,0 | 0,9978 |
| KET | NSAID | 3,00 | 4,35 | 11,6 | 258 | 6,0 | 20,0 | 0,9995 |
| NAP | NSAID | 3,10 | 4,50 | 12,4 | 230 | 3,0 | 10,0 | 0,9997 |
| DIC | NSAID | 4,02 | 4,02 | 15,0 | 275 | 10,0 | 33,0 | 0,9998 |
| MEF | NSAID | 5,28 | 0,17/4,49 | 17,0 | 222 | 15,0 | 50,0 | 0,9996 |

^a US EPA (2011) Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v. 4.1.1. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC;

^b [27];

^c Doze níveis para FUR, KET e NAP, onze para MEB e DIC, e dez para o MEF, desde 20,0 a 2000,0 $\mu\text{g/L}$.

9.2.2. Estudo da eficiência da BA μ E- μ LD(100 μL)

Para o estudo e implementação de qualquer metodologia analítica, nomeadamente a presente que opera por tecnologia de amostragem por flutuação, é necessária a otimização de vários parâmetros que podem afetar a eficiência da microextração dos seis fármacos durante o processo analítico. Assim, foram realizados ensaios sistemáticos em água ultrapura fortificada (4,0 $\mu\text{g/L}$) com os seis analitos através da BA μ E- μ LD(100 μL), para o estudo e seleção do material sorvente, tempo de extração e agitação, o pH, força iônica e polaridade da matriz, bem como o tipo de solvente e tempo de retroextração, de acordo com trabalhos anteriores [4, 21-25, 28, 29].

9.2.2.1. Caracterização das fases sorventes

Na primeira etapa do passo da otimização, começou por se testar várias fases sorventes para revestimento na BA μ E com propriedades físico-químicas distintas, que podem levar à obtenção de melhor eficiência, de acordo com outros trabalhos [4, 21-25, 28, 29]. Refira-se que o dispositivo BA μ E usado contém 7,5 mm de comprimento. Neste sentido, entre os sorventes estudados, incluem-se cinco Ps (P1-P5) e cinco ACs (AC1-AC5), usados como fases

sorventes para a microextração dos seis fármacos em água ultrapura. Entre os cinco polímeros, estes são constituídos por PS-DVB (P1), pirrolidona modificada (P2), troca catiónica/fase-reversa (P3), troca aniónica/fase-reversa (P4) e DVB (P5). Os polímeros testados, são caracterizados por apresentarem tamanhos de partícula compreendidos entre 30 e 120 μm , tamanho de poro entre 80 e 85 Å e áreas superficiais entre 800 e 1200 m^2/g , assim como grande estabilidade à variação de pH (0-14).

No caso dos ACs selecionados, apresentam áreas superficiais entre 900 e 1500 m^2/g e pH_{PZC} de 6,4, 2,2, 8,4, 7,5 e 8,5, para AC1, AC2, AC3, AC4 e AC5, respetivamente. De acordo com estas propriedades, os ACs apresentam características superficiais químicas distintas, desde ácidos, básicos e aproximadamente neutros, que podem ser decisivas para a seletividade na microextração dos compostos farmacêuticos em estudo.

Os seis fármacos em estudo, apresentam características ácidas e básicas, assim como características desde polares a apolares ($2,32 \leq \log K_{\text{OW}} \leq 5,28$), as quais podem ser determinantes para os mecanismos de interação com as fases sorventes durante o processo de microextração.

9.2.2.2. Seletividade das fases sorventes

De modo a avaliar o desempenho analítico da BA μ E- μ LD(100 μL), numa primeira fase foram realizados ensaios em água ultrapura, por forma a selecionar o sorvente adequado para revestimento entre os vários materiais disponíveis, em condições experimentais padrão: extração - 25 mL (4,0 $\mu\text{g}/\text{L}$), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μ LD - MeOH (100 μL), 30 min sob tratamento ultrassónico, de acordo com estudos anteriores [22, 23, 25, 30]. A figura 9.2, mostra o perfil de resultados obtidos na comparação da seletividade das dez fases sorventes através de BA μ E, para os seis compostos farmacêuticos alvo em água ultrapura.

De uma forma geral, a grande capacidade de sorção das fases sorventes está relacionada com a área superficial característica e respetivos mecanismos de interação que cada uma apresenta. Da mesma forma, a força de sorção depende do pH do meio envolvente, uma vez poder influenciar a carga

superficial da fase sorvente, em particular de acordo com o ponto de carga zero (pH_{PZC}) para os ACs, assim como a forma molecular dos compostos em estudo [30].

Os ACs, são materiais sólidos de natureza porosa, que retêm os analitos através de interações electrostáticas e/ou dispersivas, de acordo com as propriedades texturais, área superficial e dimensão dos poros. Por outro lado, o pH_{PZC} dos ACs vai influenciar fortemente os mecanismos de interação entre os analitos e os ACs, sendo que as características ácidas e básicas da superfície dos ACs, estão relacionadas com a composição superficial em oxigénio, azoto e hidrogénio, sendo determinante no processo de microextração dos ACs em solução. Para o caso dos polímeros testados, para além das propriedades físicas, vários mecanismos de interação podem ocorrer, nomeadamente de tipo π - π , dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio e interações iónicas, dependendo também da área superficial e tamanho de partícula de cada polímero [30].

Por observação da figura 9.2.a, são obtidas recuperações razoáveis (< 60 %) para alguns dos polímeros, exceto o FUR que apresenta valores inferiores a 30 %. As fases P1, P4 e P5 são as mais seletivas, nomeadamente para o FUR, KET, NAP e DIC, enquanto P2 e P5 apresentam maior seletividade para o MEB, e para o MEF, tendo todos os polímeros usados mostram eficiências razoáveis com ligeira vantagem para o P5. Relativamente às características individuais de cada fase, o tamanho de partícula, o tamanho do poro e a área superficial, parecem não ser críticas para as interações químicas com os analitos alvo, uma vez as áreas superficiais estarem compreendidas entre 800 e 1200 m^2/g . Assim, para os polímeros testados, o P5 é o que demonstra melhor desempenho para os seis compostos farmacêuticos alvo.

A figura 9.2.b, mostra seletividades distintas entre os ACs testados e os analitos em estudo. Enquanto para o KET, NAP, DIC e MEF o AC1 e AC2 mostram possuir melhor seletividade com eficiências compreendidas entre 35 e 50 %, para o FUR observa-se pequena vantagem (< 20 %), sendo negligenciável para o MEB quando comparadas com os outros ACs, sob condições experimentais idênticas.

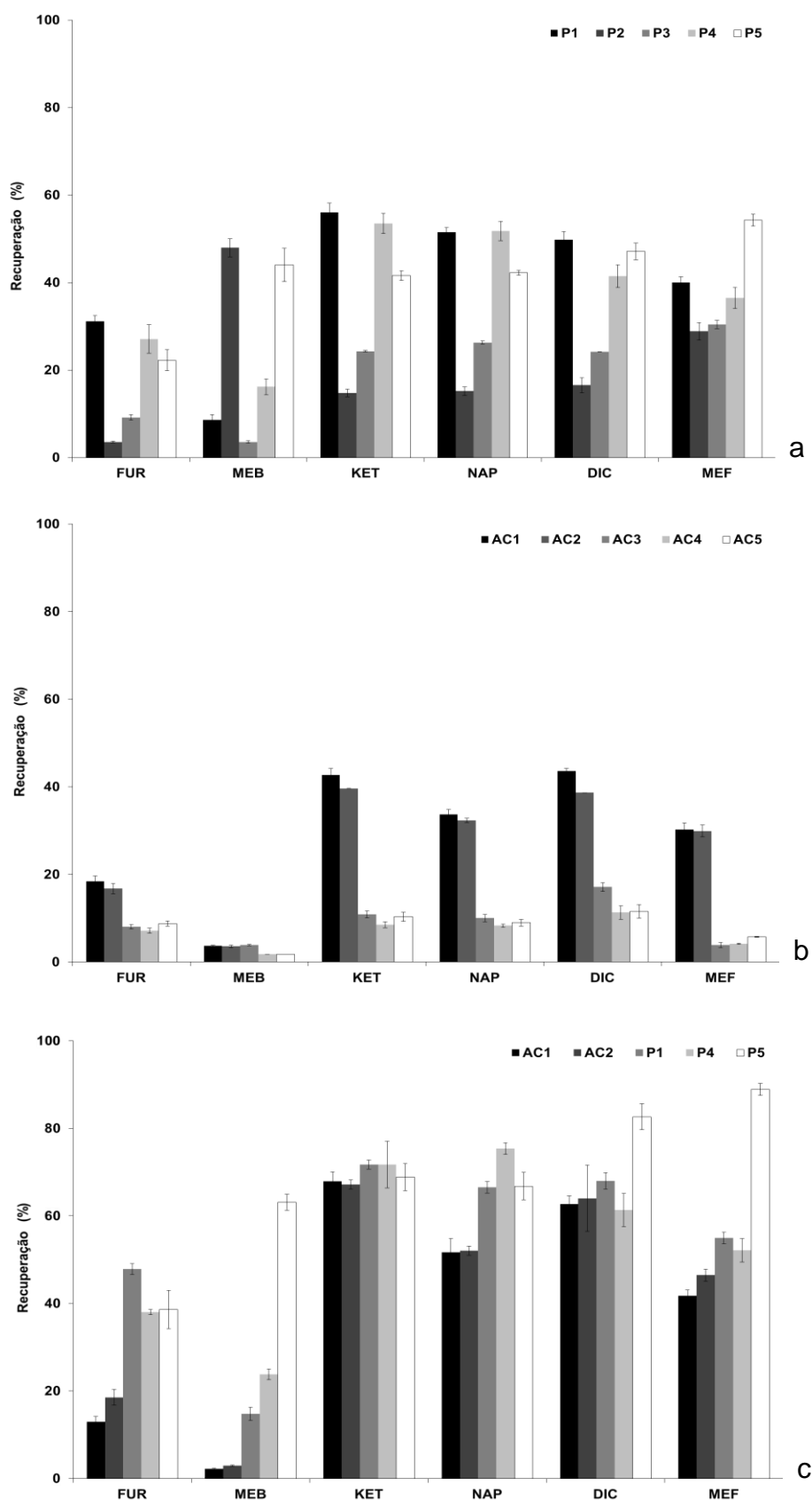


Figura 9.2 - Recuperação média obtida com diferentes Ps (a), ACs (b) e comparação entre alguns sorventes (c), para os seis fármacos em estudo em água ultrapura por BA μ E- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, em condições experimentais padrão. Condições - extração: 25 mL (4,0 μ g/L), 1000 rpm, 3 h para (a) e (b), 16 h para (c), pH 5,5; μ LD: 100 μ L, MeOH, 30 min de tratamento ultrassônico.

Conforme já referido, o pH em solução pode ter forte influência nos mecanismos de interação electrostática e/ou dispersiva entre os ACs e os analitos alvo, bem como na ionização molecular em solução. Deste modo e em particular para os ACs, para uma determinada solução na qual o pH é igual ao pH_{PZC} , a superfície do AC apresentará carga neutra, possuindo o mesmo número de cargas positivas e negativas. No caso do pH da amostra ser inferior ao pH_{PZC} , a carga superficial será positiva, e negativa se o pH da amostra for superior ao pH_{PZC} [22-24]. A pH 5,5, a carga superficial dos ACs variam desde negativa (AC2, pH_{PZC} : 2,2), até positiva/neutra (AC1, pH_{PZC} : 6,4) a carregados positivamente (AC3, pH_{PZC} : 8,4; AC4, - pH_{PZC} : 7,5; AC5, pH_{PZC} : 8,5). Por outro lado, a pH 5,5 os compostos alvo FUR, KET, NAP, DIC e MEF estão predominantemente presentes com carga negativa, enquanto MEB com carga positiva. Dos resultados obtidos, parece ocorrer simultaneamente influência do pH_{PZC} , características da superfície e a estrutura porosa nos mecanismos de interação, assim como com a geometria molecular apresentada pelos seis fármacos, uma vez o MEB apresentar comportamento diferente. Enquanto para o AC1 e AC2, o pH_{PZC} não leva a resultados distintos entre ambos, para o AC3, AC4 e AC5 apresentam recuperações baixas. Para o MEB em particular, são observadas diferenças negligenciáveis entre os ACs testados.

De todos os resultados obtidos, e para diferenciar entre P1, P4, P5, AC1 e AC2, foi avaliada a cinética do processo de microextração em condições experimentais semelhantes, embora durante 16 h. Neste sentido, a figura 9.2.c mostra o perfil obtido, onde se verifica vantagem para o MEB, DIC e MEF com P5, em comparação com os restantes compostos. Neste sentido, seleccionou-se o P5 como fase de revestimento para a BA μ E, para prosseguir para ensaios posteriores, uma vez que demonstrou o melhor compromisso de seletividade para os analitos em estudo e as restantes fases, sob condições experimentais idênticas.

9.2.2.3. Estudo do efeito dos parâmetros da μ LD

No presente estudo, pretendia-se aplicar o dispositivo BA μ E reduzido para metade, em combinação com a retroextração efetuada num único passo, sendo

para além de ambientalmente favorável, de maior facilidade na manipulação experimental. Assim, usando um *insert* colocado no interior dum vial (1,5 mL) [23, 25] e reduzindo para 100 μ L de volume de solvente adequado, aumenta-se o fator de concentração para 250x, e consequentemente a sensibilidade. A figura 9.3, mostra uma imagem que ilustra um vial contendo o dispositivo reduzido a metade em 100 μ L de solvente orgânico para μ LD.



Figura 9.3 - Imagem ilustrativa usando 100 μ L de solvente no passo de retroextração.

Deste modo, e após selecionar a melhor fase de revestimento para o enriquecimento dos seis compostos farmacêuticos selecionados através de BA μ E, o passo seguinte consistiu na otimização dos parâmetros que podem afetar a eficiência da retroextração, por forma a obter máxima resposta analítica.

Neste sentido, começou por se avaliar o efeito do tipo de solvente e o tempo de tratamento ultrassónico, por forma a obter as condições que promovem a libertação completa dos compostos da fase P5. A escolha do melhor solvente é de grande importância, uma vez que deve ter força suficiente para uma remoção rápida e eficiente dos analitos em estudo, assim como ser compatível com o sistema instrumental de análise [31]. Desta forma, foram efetuados estudos sistemáticos em água ultrapura fortificada (4,0 μ g/L) por BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L), no sentido de otimizar o solvente e tempo da retroextração. Consequentemente, 100 μ L em ACN, MeOH e mistura de ACN/MeOH (1:1, v/v) foram testados, de modo a saber qual o solvente mais

adequado. A figura 9.4, mostra o perfil obtido para os solventes testados, onde se verifica que a mistura ACN/MeOH (1:1, v/v) leva à melhor eficiência, tendo sido selecionada para o processo de retroextração em estudos posteriores. De seguida, e uma vez o tempo de dessorção poder ser igualmente crítico, foram estudados período de 15, 30, 45 e 60 min. Pelo perfil obtido para os tempos de retroextração estudados, a melhor eficiência foi obtida após 60 min (dados não apresentados). No sentido de averiguar eventuais retenções na BAμE(P5) e/ou efeitos de memória ou *carryover*, foram efetuadas diversos μLD consecutivas das mesmas barras de microextração e injetadas no HPLC-DAD. Nos resultados observados, o ruído gerado foi sempre inferior aos LODs instrumentais.

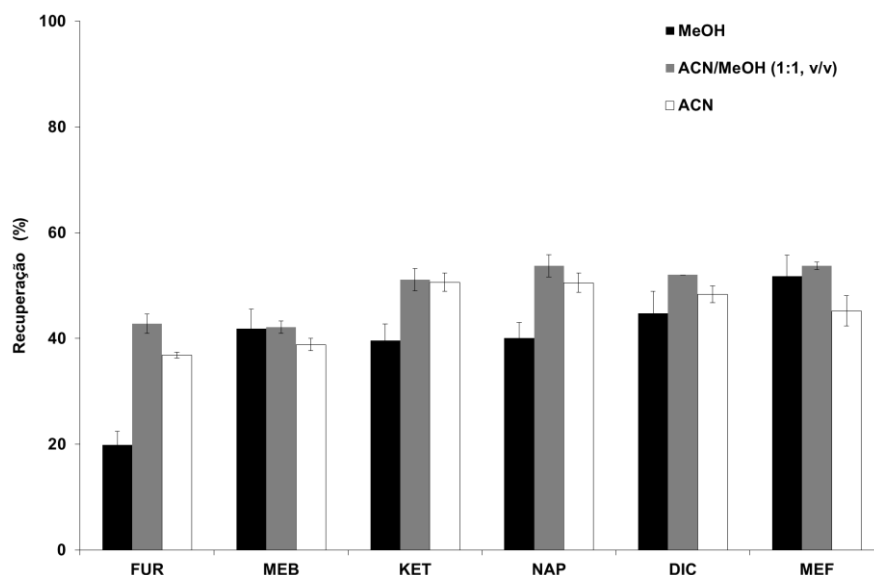


Figura 9.4 - Efeito do solvente na retroextração dos seis fármacos da BAμE(P5, 0,9 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD. Condições - extração: 25 mL (4,0 μg/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μLD: 100 μL, 30 min de tratamento ultrassônico.

Através dos dados obtidos, pode-se afirmar que 100 μL de solvente de dessorção mostrou ser eficiente no passo da retroextração, seguindo a tendência relativa aos princípios da química verde. No entanto, é imperativa a seleção do solvente mais adequado, por forma a alcançar a melhor eficiência no que respeita à remoção dos analitos da fase sorvente, assim como a compatibilidade com o sistema de HPLC.

Neste sentido, nos estudos posteriores será utilizada a mistura ACN/MeOH (1:1, v/v) sob 60 min de tratamento ultrassônico.

9.2.2.4. Estudo do efeito dos parâmetros da BAμE(P5, 0,9 mg)

Durante o processo de microextração, alguns parâmetros cinéticos podem afetar o equilíbrio entre os analitos, a fase sorvente e a matriz aquosa, nomeadamente o tempo de equilíbrio e a velocidade de extração [4, 5, 21-25, 28, 29]. A velocidade de agitação, tem um papel importante na eficiência da microextração, uma vez que controla a difusão de transferência de massa dos analitos alvo para a fase sorvente, podendo limitar o processo analítico [26], nomeadamente a microextração por flutuação. Deste modo, foram efetuados ensaios para testar as velocidades de 750, 1000 e 1250 rpm à temperatura ambiente, onde o perfil obtido mostrou vantagem para 1250 rpm, o qual foi selecionado para estudos posteriores (dados não apresentados).

Posteriormente, o tempo de equilíbrio foi igualmente estudado durante o enriquecimento através da tecnologia de amostragem por flutuação, onde a interação entre os compostos alvo em solução e a fase de revestimento é baseado num processo de equilíbrio, o qual depende do tempo de exposição entre ambas as partes envolvidas no processo analítico. Assim, foram realizados ensaios de 1, 2, 3 e 16 horas à temperatura ambiente, para os seis compostos farmacêuticos selecionados. A figura 9.5.a, mostra o perfil obtido para os tempos de extração estudados, observando-se um aumento lento na recuperação média, tendo sido atingido máxima eficiência para as 16 h de extração, permitindo atingir recuperações entre 80 e 90 % para o FUR, MEB e MEF, e cerca de 100 % para os restantes. Neste sentido, sendo a cinética lenta, foi selecionado o tempo de 16 horas para estudos posteriores. No entanto, para o processo de otimização, nomeadamente o estudo do pH, polaridade e força iónica, foram usadas 3 horas para extração, no sentido de facilitar o tempo despendido nos ensaios.

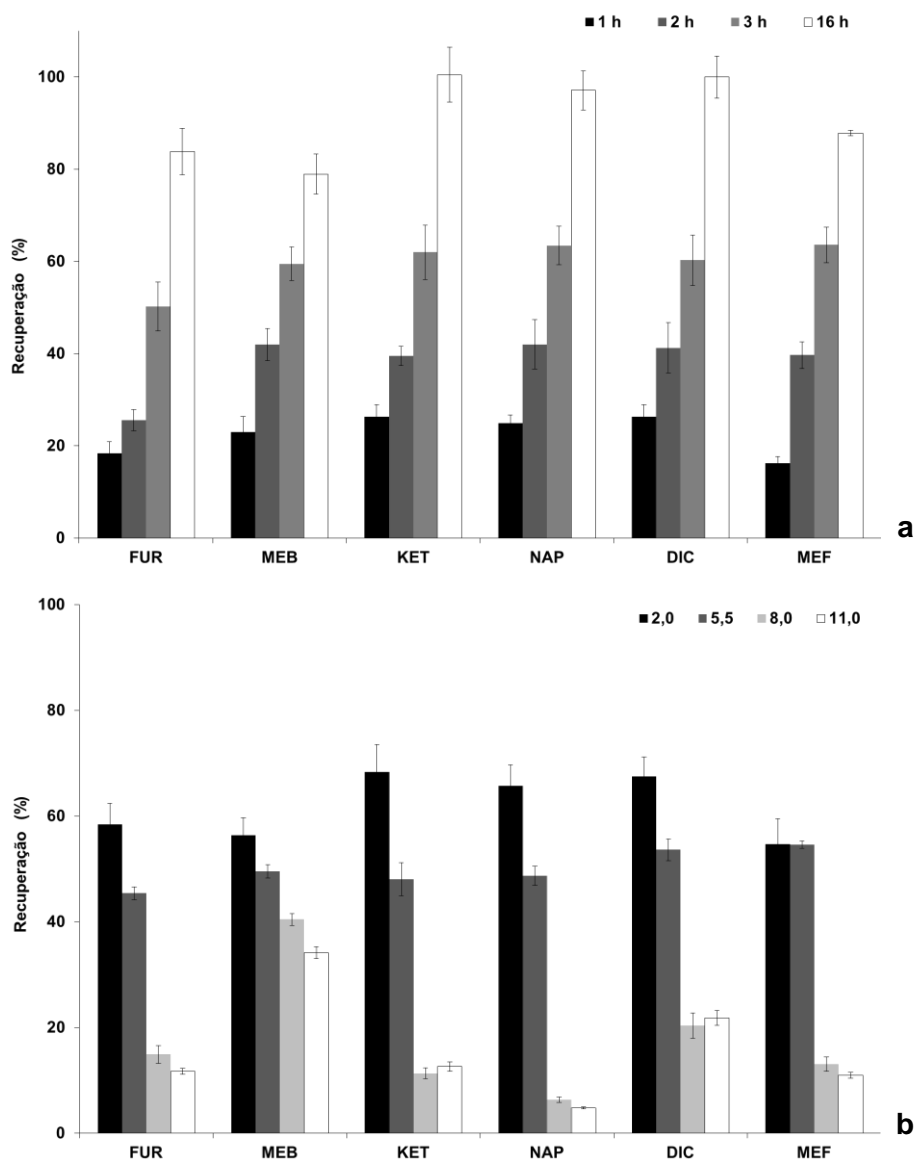


Figura 9.5 - Efeito do tempo de extração (a) e pH (b) na eficiência de extração dos seis fármacos por BAμE(P5, 0,9 mg)-μLD(100 μL)/HPLC-DAD. Condições - (a) extração: 25 mL (4,0 μg/L), 1250 rpm, pH 5,5; μLD: 100 μL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 60 min de tratamento ultrassônico; (b) extração: 25 mL (4,0 μg/L), 1250 rpm, 3 h; μLD: 100 μL, ACN/MeOH (1:1, v/v), 60 min de tratamento ultrassônico.

O pH da matriz é um parâmetro de extrema importância, uma vez poder influenciar a forma molecular dos analitos alvo em solução, assim como a carga superficial do material de revestimento para microextração, afetando diretamente a eficiência da fase P5 durante o processo [21]. Deste modo, foram realizados ensaios em água ultrapura fortificada (4 μg/L) por BAμE(P5, 0,9 mg), para testar pHs de 2,0, 5,5, 8,0 e 11,0 à temperatura ambiente. Como se pode observar na figura 9.5.b, a melhor eficiência foi obtida a pH 2,0 para os compostos em

estudo. Uma vez a maioria dos fármacos em estudo apresentar características ácidas, nomeadamente o KET, NAP, DIC, MEF [5, 11, 32] e FUR [6, 33], a sua forma neutra é predominante a pH ácido, favorecendo a microextração analítica, exceto para o MEB o qual apresenta características básicas [34]. Assim, em soluções com condições ácidas, as espécies de KET, NAP, DIC, MEF e FUR estão presentes na forma molecular neutra, enquanto que para soluções em condições básicas ($\text{pH} > 12$), MEB apresenta-se na forma molecular neutra, estando com carga positiva a pH inferior a 8,0 [27]. No que respeita aos analitos ácidos, os resultados estão de acordo com a previsão das espécies predominantes. Neste contexto, para o caso do MEB, a microextração por BA μ E(P5, 0,9 mg), depende do pH embora pareça ser igualmente dependente da geometria molecular, influenciada por eventuais interações hidrofílicas e/ou hidrofóbicas; MEB apresenta uma cadeia alquila média, em vez da forma de tipo esférica, tal como apresentada pelos outros fármacos (FUR, KET, NAP, DIC e MEF). Deste modo, é notório o controlo do pH ser essencial, por forma a aumentar a migração dos analitos alvo para a fase P5, e consequentemente, o pH 2,0 foi selecionado para estudos posteriores.

Subsequentemente, foi estudada a força iónica através da adição de um eletrólito, podendo favorecer a migração dos compostos orgânicos para a fase sorvente e afetar a eficiência do processo de microextração, em particular dos compostos polares ($\log K_{OW} < 3$). Duma forma geral, o aumento da eficiência dos analitos mais polares é conseguida pela adição de sais devido ao efeito de *salting-out*, o qual é baseado na redução da solubilidade dos analitos, promovendo a migração dos mesmos para a fase sorvente [5, 19]. Desta forma, foram realizados ensaios com a adição de NaCl com a percentagem de 0, 5, 10 e 15 % (p/v) em água ultrapura à temperatura ambiente. Do perfil obtido, foi observada ligeira redução na eficiência para o NAP e DIC e variações negligenciáveis para os restantes analitos alvo (dados não apresentados).

Por último, foi estudada a polaridade da matriz, a qual pode ser alterada ou controlada pela adição dum solvente orgânico, o qual elimina ou reduz o *wall-effect*. Este fenómeno baseia-se na adsorção dos compostos com características mais hidrofóbicas nas paredes de vidro dos frascos de amostragem, o que pode reduzir a eficiência do processo de microextração [35]. Assim, foram realizados

ensaios com adição de MeOH contendo percentagens de 0, 5, 10 e 15 % (v/v) em água ultrapura e à temperatura ambiente. O perfil de dados obtido, mostra uma redução acentuada na eficiência média para todos os fármacos selecionados (dados não apresentados). Deste modo, para estudos posteriores, a metodologia proposta será desenvolvida sem a adição de NaCl e MeOH. Após obtidas as condições experimentais otimizadas, apesar da presente metodologia necessitar de tempo de extração elevado (16 h) para atingir a máxima eficiência possível, o processo de microextração possui a vantagem de poder ser executado durante a noite sem quaisquer condições especiais e sem a presença do operador.

9.2.3. Validação da metodologia BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD

Após otimizados os parâmetros e por forma a maximizar o desempenho analítico da metodologia BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, estabeleceram-se as seguintes condições experimentais para prosseguir para a validação do método - BA μ E(P5, 0,9 mg): 25 mL, 1250 rpm, 16 h, pH 5,5; μ LD: ACN/MeOH (1:1, v/v), 100 μ L, 60 min de tratamento ultrassónico. Posteriormente, no sentido de avaliar a eficiência da metodologia proposta, foram realizados ensaios com 25 mL em água ultrapura fortificada (4,0 μ g/L), onde se obtiveram eficiências desde 91,4 % (FUR) a 101,0 % (KET), tendo-se obtido boa precisão (RSD < 10,6 %). A sensibilidade da metodologia proposta, foi estudada através do cálculo dos limiares analíticos, tendo-se obtido LODs compreendidos entre 25,0 e 120,0 ng/L e LOQs entre 83,0 e 400,0 ng/L, determinados através de S/N igual a 3 e 10, respetivamente. A calibração da metodologia foi efetuada em água ultrapura, numa gama de concentrações desde 0,1 a 24,0 μ g/L, com treze níveis de concentração, na qual se obteve boa linearidade com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9983 e precisão inferior a 12,0 % (RSD; 0,6 μ g/L, MEF). A tabela 9.2, resume a recuperação experimental otimizada obtida, limiares analíticos, gama de concentrações estudada e coeficientes de determinação (r^2), para a metodologia BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

Tabela 9.2 - Recuperação média, LODs, LOQs, gama de linear de concentrações e coeficientes de determinação (r^2) obtidos para os seis fármacos em estudo, através do método BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

| Fármacos | Recuperação ^a (\pm RSD) | LODs (ng/L) | LOQs (ng/L) | Gama ^b (μ g/L) | r^2 |
|----------|--|----------------|----------------|-----------------------------------|--------|
| FUR | 91,4 \pm 5,4 | 30,0 | 100,0 | 0,1-24,0 | 0,9997 |
| MEB | 96,3 \pm 3,4 | 60,0 | 200,0 | 0,2-24,0 | 0,9987 |
| KET | 101,0 \pm 4,6 | 50,0 | 165,0 | 0,2-24,0 | 0,9984 |
| NAP | 100,1 \pm 3,1 | 25,0 | 83,0 | 0,1-24,0 | 0,9983 |
| DIC | 99,1 \pm 3,1 | 100,0 | 330,0 | 0,4-24,0 | 0,9988 |
| MEF | 92,2 \pm 10,6 | 120,0 | 400,0 | 0,4-24,0 | 0,9985 |

^a 4,0 μ g/L, n=3;

^b 0,2-24,0 μ g/L com doze níveis e 0,4-24,0 μ g/L com onze níveis de concentração.

A figura 9.6, mostra um cromatograma relativo a um ensaio de recuperação em água ultrapura fortificada (4,0 μ g/L) contendo os seis fármacos em estudo, obtido por BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas, onde é observado bom desempenho analítico.

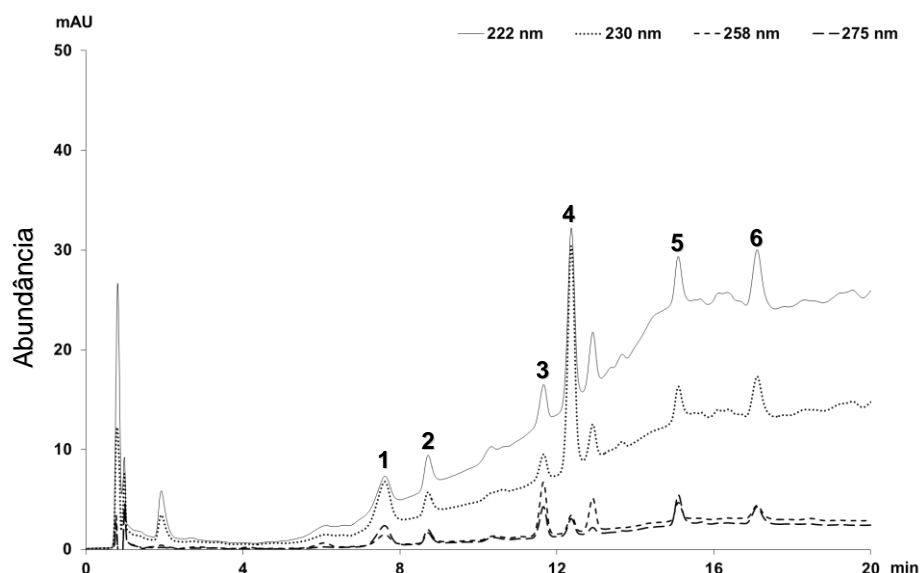


Figura 9.6 - Cromatograma referente ao ensaio de recuperação a 4,0 μ g/L para os seis fármacos em estudo, obtido por BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-FUR, 2-MEB, 3-KET, 4-NAP, 5-DIC, 6-MEF.

Seguidamente, a repetibilidade foi igualmente avaliada, tendo sido efetuados ensaios no mesmo dia (três ensaios) e em três dias diferentes (nove ensaios), para a metodologia proposta. Assim, para o efeito foram realizados ensaios em água ultrapura para níveis de 0,4, 1,0, 8,0 e 16,0 µg/L em triplicado e no mesmo dia, e para o nível de 4,0 µg/L em triplicado e em três dias diferentes. A tabela 9.3 apresenta todos os resultados obtidos para os ensaios de repetibilidade, através da metodologia BAµE(P5, 0,9 mg)-µLD(100 µL)/HPLC-DAD.

Tabela 9.3 - Recuperações médias e precisões (% ± RSD), obtidas nos ensaios de repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes por BAµE(P5, 0,9 mg)-µLD(100 µL)/HPLC-DAD para os seis fármacos em estudo, sob condições experimentais otimizadas.

| Fármacos | Recuperação (% ± RSD) | | | | |
|----------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|--|
| | Repetibilidade ^a | | | | Repetibilidade em dias diferentes ^b |
| | 0,4 µg/L | 1,0 µg/L | 8,0 µg/L | 16,0 µg/L | 4,0 µg/L |
| FUR | 97,3 ± 5,0 | 96,4 ± 7,4 | 90,8 ± 4,4 | 92,8 ± 5,8 | 92,0 ± 7,9 |
| MEB | 94,7 ± 6,9 | 100,7 ± 5,5 | 93,3 ± 5,7 | 94,3 ± 5,6 | 93,4 ± 10,0 |
| KET | 101,0 ± 7,3 | 103,0 ± 9,2 | 98,9 ± 6,9 | 99,8 ± 6,4 | 95,7 ± 9,6 |
| NAP | 96,2 ± 5,7 | 96,4 ± 3,2 | 100,4 ± 2,7 | 98,8 ± 2,4 | 99,8 ± 3,2 |
| DIC | 93,3 ± 10,1 | 94,4 ± 5,9 | 93,8 ± 2,1 | 99,3 ± 10,0 | 97,2 ± 8,4 |
| MEF | 102,3 ± 10,4 | 91,6 ± 7,4 | 90,0 ± 5,2 | 93,3 ± 2,3 | 90,3 ± 6,4 |

^a n = 3;

^b n = 9 em três dias consecutivos.

No que respeita à eficiência nos ensaios de repetibilidade no mesmo dia, foram obtidas boas recuperações médias desde 90,0 % (MEF, 8,0 µg/L) a 103,0 % (KET, 1,0 µg/L) para as concentrações usadas, assim como excelentes precisões (RSD) compreendidas entre 2,1 % (DIC, 8,0 µg/L) e 10,4 % (MEF, 0,4 µg/L). Relativamente à repetibilidade em dias diferentes, efetuados em água ultrapura fortificada (4,0 µg/L), foram obtidas recuperações compreendidas entre 90,3 ± 6,4 % (MEF) e 99,8 ± 3,2 % (NAP).

A metodologia proposta no presente estudo, usando o dispositivo reduzido para metade do tamanho convencional (BA μ E(P5, 0,9 mg)) e redução do solvente de retroextração ao nível dos microlitros (μ LD(100 μ L)), demonstrou excelente desempenho analítico. Todavia, a sensibilidade analítica da metodologia proposta, pode ainda ser melhorada com recurso a hifenação a espectrometria de massa ou sistemas *tandem* (LC-MS ou LC-MS/MS), reduzindo consideravelmente os LODs e sendo importante na identificação inequívoca dos analitos em estudo, em particular no estudo de matrizes de complexidade elevada.

Quando a presente metodologia é comparada com outras técnicas de microextração estática, nomeadamente SBSE(PDMS) para alguns dos fármacos estudados no presente estudo [5], na metodologia proposta são obtidas recuperações muito superiores e sem usar quaisquer outros passos, nomeadamente a derivatização [18].

9.2.4. Aplicação da metodologia BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD a matrizes reais

A aplicação da presente metodologia em matrizes reais, é um passo imprescindível por forma a demonstrar a capacidade analítica da metodologia BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD. Deste modo, a metodologia proposta que opera através da tecnologia de amostragem por flutuação, foi aplicada em matrizes diversas, nomeadamente água de rio, água subterrânea, água estuarina, água de mar e água residual, bem como em amostras biológicas nomeadamente urina. Dado que a maioria das matrizes reais apresenta elevada complexidade, recorre-se usualmente ao SAM de modo a minimizar os efeitos existentes nas mesmas, sendo igualmente adequada para quantificação dos seis compostos alvo, sendo a melhor estratégia analítica para o efeito [21-23, 25, 30].

Assim, para as amostras testadas, foram efetuados ensaios por BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD usando a metodologia SAM, fortificando as amostras reais com quatro níveis de concentração compreendidas entre 4,0 e 16,0 μ g/L constituídos pela mistura dos seis fármacos em estudo, efetuando

igualmente o ensaio em branco sem qualquer fortificação (C_0). A tabela 9.4 resume os resultados obtidos por SAM, nomeadamente os coeficientes de determinação, nas matrizes reais estudadas, sob condições experimentais otimizadas.

No caso das amostras de água estudadas, nas águas de rio e subterrânea não foram detetados quaisquer dos analitos em estudo. No entanto, foi detetado NAP nas águas estuarinas e residual #1, assim como FUR na amostra de água do mar, com níveis de $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g/L}$ (estuário), $2,00 \pm 0,30 \mu\text{g/L}$ (subterrânea) e $2,30 \pm 0,10 \mu\text{g/L}$ (mar), respetivamente. No que respeita aos coeficientes de determinação obtidos, estão compreendidos entre 0,9941 (MEF) e 0,9998 (NAP).

Tabela 9.4 - Coeficientes de determinação obtidos para os seis fármacos em estudo através do SAM nas matrizes reais estudadas, através de BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μL)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

| | Água rio | Água subterrânea | Água estuarina | Água mar | Água residual #1 | Água residual #2 | Urina (U_0) |
|----------|-------------|---------------------|-------------------|-------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Fármacos | r^2 | | | | | | |
| FUR | 0,9990 | 0,9968 | 0,9956 | 0,9976 | 0,9987 | 0,9949 | 0,9970 |
| MEB | 0,9986 | 0,9975 | 0,9966 | 0,9955 | 0,9981 | 0,9947 | 0,9992 |
| KET | 0,9998 | 0,9992 | 0,9960 | 0,9984 | 0,9949 | 0,9993 | 0,9992 |
| NAP | 0,9984 | 0,9989 | 0,9998 | 0,9990 | 0,9992 | 0,9992 | 0,9994 |
| DIC | 0,9985 | 0,9979 | 0,9963 | 0,9949 | 0,9965 | 0,9994 | 0,9959 |
| MEF | 0,9981 | 0,9980 | 0,9978 | 0,9947 | 0,9941 | 0,9979 | 0,9930 |

Posteriormente, a presente metodologia foi aplicada a amostras de urina. Conforme já referido, algumas substâncias farmacêuticas não são metabolizadas na totalidade pelo organismo humano, sendo alguns fármacos libertados na sua forma molecular original, apesar da percentagem desta depender de cada fármaco em particular [9]. Desta forma, no presente estudo a quantificação dos fármacos alvo foi efetuada sem qualquer derivatização. A primeira urina a ser testada, foi obtida dum dador livre de qualquer das substâncias farmacêuticas em estudo, sendo usada como amostra controlo (U_0), para testar o

comportamento analítico dos analitos alvo. Conforme esperado, não foi detetada a presença de nenhum dos analitos em estudo, tendo-se mesmo assim obtido coeficientes de determinação superiores a 0,9930. As duas urinas estudadas seguidamente, eram originárias dum dador que tinha ingerido DIC, o qual estava inserido num tratamento clínico planeado sob vigilância médica. A primeira abordagem, consistiu na análise à urina (U_1) quando o dador estava em tratamento clínico com comprimidos que continham DIC. A segunda urina (U_2), foi recolhida na segunda fase do tratamento, por aplicação de creme em área específica, contendo igualmente DIC como substância ativa. Da aplicação da metodologia proposta para a análise de ambas as urinas, foi detetado DIC em U_1 e U_2 para níveis de $177,30 \pm 2,50 \mu\text{g/L}$ e $57,30 \pm 1,00 \mu\text{g/L}$, respetivamente. A linearidade obtida para ambas as urinas relativamente ao DIC, mostraram coeficientes de determinação de 0,9961 e 0,9959, respetivamente. A figura 9.7, ilustra um cromatograma referente à sobreposição de cromatogramas parciais dos ensaios não fortificados em água de mar, residual #1 e urina (U_1), obtidas pela presente metodologia, onde é de realçar a presença de FUR, KET e DIC, respetivamente.

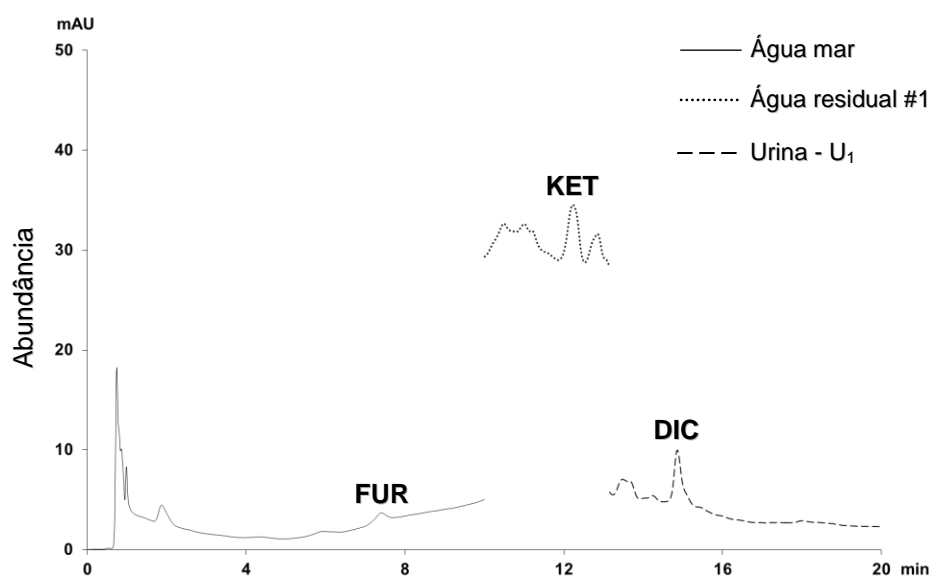


Figura 9.7 - Cromatogramas parciais referentes aos ensaios não fortificados efetuados em água de mar, água residual #1 e em urina (U_1), obtidos pelo SAM por BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

Em resumo, foram obtidas boas linearidades para todas as matrizes estudadas, onde a sensibilidade no geral não foi afetada, apresentando declives com a mesma ordem de grandeza com variações negligenciáveis.

A metodologia proposta no presente estudo, mostrou ser de fácil execução experimental, eficiente e amiga do ambiente para análise residual de diversos fármacos, apresentando boa seletividade e sensibilidade para amostras com grau de complexidade elevado.

9.3. CONCLUSÕES

No presente estudo, a metodologia proposta (BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD), usando um polímero seletivo (PS-DVB) como fase de revestimento num dispositivo de dimensão reduzida e com diminuição do volume de solvente na LD, foi desenvolvida, otimizada e validada para a monitorização simultânea de seis fármacos (FUR, MEB, KET, NAP, DIC e MEF) em matrizes reais. Nas condições experimentais otimizadas, obteve-se excelente desempenho analítico, incluindo boa eficiência, precisão adequada, limiares analíticos ao nível dos ppt's e boa gama linear dinâmica. A aplicação da metodologia em matrizes reais, nomeadamente em amostras de água e biológicas, mostrou boa seletividade, sensibilidade e bom desempenho analítico com recurso ao SAM.

A redução do volume de solvente de retroextração para 100 μ L, proposto no presente estudo, demonstrou excelente desempenho analítico, permitindo incrementar o fator de enriquecimento para 250x. Este avanço, permitiu aumentar a sensibilidade da metodologia, obtendo LODs mais baixos mesmo usando instrumentação convencional como o HPLC-DAD, podendo ser uma vantagem inequívoca para o caso das amostras reais com elevada complexidade e com analitos presentes em concentrações ultra-vestigiais.

Em resumo, a presente metodologia (BA μ E(P5, 0,9 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD), que opera sob a tecnologia de amostragem por flutuação, revelou ser uma técnica analiticamente robusta, permitindo selecionar a fase

sorvente mais adequada, mas também de fácil e rápida execução experimental, implementação, eficiente e favorável ambientalmente, assim como seletiva e sensível para a monitorização de resíduos de fármacos em amostras de água e biológicas.

9.4. REFERÊNCIAS

1. Almeida, C.; Ahmad, S. M.; Nogueira, J. M. F.; Advances on Bar Adsorptive Microextraction Technique - Application for the determination of pharmaceuticals in real matrices. Submetido.
2. Buchberger, W. F.; Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 603-618.
3. Fatta, D.; Nikolaou, A.; Achilleos, A.; Meriç, S.; Analytical methods for tracing pharmaceuticals residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry* 26(6) (2007) 515-533.
4. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 1355-1364.
5. Silva, A. R. M.; Portugal, F. C. M.; Nogueira, J. M. F.; Advances in Stir Bar Sorptive Extraction for the Determination of Acidic Pharmaceuticals in Environmental Water Matrices – Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases. *Journal of Chromatography A* 1209 (2008) 10-16.
6. Bosch, M. E.; Sánchez, A. J. R.; Rojas, F. S.; Ojeda, C. B.; Recent developments in analytical determination of furosemide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 519-532.
7. Walash, M. I.; El-din, M. M. K. S.; El-enany, N. M.; Eid, M. I.; Shalan, S. M.; Simultaneous determination of sulpiride and mebeverine by HPLC method using fluorescence detection: application to real human plasma. *Chemistry Central Journal* 6 (2012) 13-24.
8. Agüera, A.; Bueno, M. J. M.; Fernández-Alba, A. R.; New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. *Environmental Science and Pollution Research* (2013).
9. Riaño, S.; Alcudia-Léon, M. C.; Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M.; Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by the combination of stir

membrane liquid-liquid-liquid microextraction and liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 2583-2589.

10. Broecker, S.; Pragst, F.; Bakdash, A.; Herre, S.; Tsokos, M.; Combined use of liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) and high performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-DAD) in systematic toxicological analysis. *Forensic Science International* 212 (2011) 215-226.

11. Samaras, V. G.; Thomaidis, N. S.; Stasinakis, A. S.; Lekkas, T. D.; An analytical method for the simultaneous trace determination of acidic pharmaceuticals and phenolic endocrine disrupting chemicals in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (2011) 2549-2561.

12. Togola, A.; Budzinski, H.; Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 1177 (2008) 150-158.

13. López-Serna, R.; Jurado, A.; Vázquez-Suñé, E.; Carrera, J.; Petrović, M.; Barceló, D.; Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environmental Pollution* 174 (2013) 305-315.

14. Verlicchi, P.; Al Aukidy, M.; Galletti, G.; Petrović, M.; Barceló, D.; Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment* 430 (2012) 109-118.

15. Gomes, P. C. F. L.; Barnes, B. B.; Santos-Neto, A. J.; Lancas, F. M.; Snow, N. H.; Determination of steroids, caffeine and methylparaben in water using solid phase microextraction-comprehensive two dimensional gas chromatography–time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1299 (2013) 126-130.

16. Rodriguez, I.; Carpinteiro, J.; Quintana, J. B.; Carro, A. M.; Lorenzo, R. A.; Cela, R.; Soli-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples. *Journal of Chromatography A* 1024 (2004) 1-8.

17. Ameli, A.; Kalhor, H.; Alizadeh, N.; Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs using electrochemically controlled solid-phase microextraction based on nanostructure molecularly imprinted polypyrrole film coupled to ion mobility spectrometry. *Journal of Separation Science* 36 (2013) 1797-1804.

18. Pintado-Herrera, M. G.; González-Mazo, E.; Lara-Martín, P. A.; Environmentally friendly analysis of emerging contaminants by pressurized hot water extraction–stir bar sorptive extraction–derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 401-411.

19. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 1303-1311.

20. Neng, N. R.; Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; Adsorptive micro-extraction techniques-Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7303-7310.
21. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction-Application to trace level analysis of fungicides in real matrices, *Journal of Chromatography A* 1265 (2012) 7-16.
22. Almeida, C.; Stępkowska, A.; Alegre, A.; Nogueira, J. M. F.; Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A*, 1311 (2013) 1-10.
23. Almeida, C.; Strzelczyk, R.; Nogueira, J. M. F.; Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique-Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices. *Talanta* 120 (2014) 126-134.
24. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibric acid in environmental and biological matrices. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6263-6270.
25. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A* 1348 (2014) 17-26.
26. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.; Stir Bar Sorptive extraction (SBSE) a novel Extraction Technique for aqueous samples: Theory and Principles. *Journal of Microcolumn Separations* 11 (1999) 737-747.
27. Hilal, S. H.; Karickhoff, S. W.; Carreira, L. A.; A Rigorous Test for SPARC's Chemical Reactivity Models: Estimation of More Than 4300 Ionization pK_as Quantitative Structure-Activity Relationships 14 (1995) 348-355.
28. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) with in situ derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 3155-3163.
29. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices. *Talanta* 83 (2011) 1643-1649.
30. Nogueira, J. M. F.; Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta* 757 (2012) 1-10.
31. Coelho, E.; Perestrelo, R.; Neng, N. R.; Câmara, J. S.; Coimbra, M. A.; Nogueira, J. M. F.; Rocha, S. M.; Optimization of Stir Bar Sorptive Extraction and Liquid Desorption

Combined with Large Volume Injection-Gas Chromatography-Quadrupole Mass Spectrometry for the Determination of Volatile Compounds in Wines. *Analytica Chimica Acta* 624 (2008) 79-89.

32. Jedziniak, P.; Szprengier-Juszkiewicz, T.; Pietruk, K.; Śledzińska, E.; Żmudzki, J.; Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 2955-2963.

33. Pous-Torres, S.; Torres-Lapasió, J. R.; Baeza-Baeza, J. J.; García-Álvarez-Coque, M. C.; Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds. *Journal of Chromatography A* 1163 (2007) 49-62.

34. Stockis, A.; Guelen, P. J. M.; de Vos, D.; Identification of mebeverine acid as the main circulating metabolite of mebeverine in man. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29 (2002) 335-340.

35. Serôdio, P.; Nogueira, J. M. F.; Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* 517 (2004) 21-32.

CAPÍTULO 10

DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE
HORMONAS ESTEROIDES SEXUAIS EM
MATRIZES REAIS POR MICROEXTRAÇÃO
ADSORTIVA EM BARRA (BA μ E) [1]

10.1. NOTA INTRODUTÓRIA

As hormonas esteroides sexuais são por definição substâncias ativas que regulam a diferenciação sexual, o desenvolvimento das características femininas e masculinas, e são responsáveis pelo funcionamento normal de alguns órgãos [2, 3]. Neste grupo, incluem-se as classes dos estrogénios endógenos (estriol, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estrona e mestranol), estrogénios exógenos (17 α -etinilestradiol), progestógenos endógenos (progeterona) e os progestógenos exógenos (19-nortisterona e D-(-)-norgestrel). Estas substâncias ativas pertencem a um grupo denominado de desreguladores endócrinos, os quais são poluentes químicos exógenos que após o contacto com organismos vivos, podem desregular o sistema endócrino do mesmo, levando a efeitos prejudiciais ao nível da reprodução e desenvolvimento na vida selvagem e nos humanos [4]. O modo de atuação dos desreguladores endócrinos, ocorre através da simulação ou mimetismo por mecanismos agonista e/ou antagonista, modificando o funcionamento padrão de síntese, metabolismo e os níveis de recetores hormonais, levando ao ressurgimento de diversos problemas, nomeadamente ao nível da reprodução, deficiências congénitas e metabólicas, entre outras [3, 5]. A presença destas substâncias no meio aquático, pode ficar a dever-se a diversas razões, nomeadamente às terapias clínicas, tratamentos oncológicos e dermatológicos, através da excreção humana, assim como atividades veterinárias [4-6]. Para os casos em que é necessária a quantificação toxicológica e farmacológica em investigação biomédica, o recurso a matrizes de urina é comum, para obter uma interpretação médica relativamente ao metabolismo em humanos e animais, mau funcionamento de glândulas e perturbações endócrinas, as quais podem ser associadas a diversas doenças, nomeadamente o cancro, anorexia e pseudohermafroditismo [3]. As hormonas esteroides são excretadas do corpo humano na forma molecular parente ou conjugada [7], sendo que a principal reação de metabolização das hormonas endógenas é através da glucoronidação no fígado e excretadas na urina [8], apesar de estarem relatados hormonas que foram metabolizadas na forma sulfatada [2, 9, 10].

Atualmente, existe elevada preocupação por parte da comunidade científica no desenvolvimento de novas estratégias analíticas para a análise de hormonas esteroides sexuais em águas e urina. Duma forma geral, os protocolos analíticos existentes para a monitorização destas hormonas, são baseados em ensaios biológicos ou técnicas cromatográficas [3, 11]. Ensaios biológicos, nomeadamente os imunoenzimáticos específicos, são rápidos e de baixo custo, embora apresentem sensibilidade insuficiente, podendo originar falsos resultados positivos devido à semelhança estrutural entre os estrogénios [10, 12]. Por este facto, os métodos cromatográficos tornaram-se os métodos de eleição para a análise das hormonas esteroides, uma vez que permitem a identificação exata de todos os analitos com interesse associada a elevada sensibilidade.

Presentemente, as estratégias analíticas de topo normalmente adotadas, têm sofrido grande evolução, incluindo os procedimentos de enriquecimento prévios à análise por GC, HPLC ou acopladas a MS (GC-MS ou LC-MS). Os métodos sortivos são normalmente as técnicas adotadas como métodos de enriquecimento, nomeadamente a SPE [4, 6] e a SPME [13], para a monitorização das hormonas esteroides. Na última década, a extração sortiva em barra (SBSE), foi proposta como uma técnica alternativa à análise de hormonas esteroides em matrizes reais [3, 7, 14], apesar de apresentar limitações ao nível da seletividade e sensibilidade.

Neste contexto, a BA μ E [15] apresenta-se como uma técnica de enriquecimento prévio no modo estático, demonstrando ser uma excelente alternativa para diversos tipos de compostos, polares e semi-polares, e em diversos tipos de matrizes [16-20], quando comparada com outros métodos sortivos [21]. Recentemente, esta técnica sofreu diversos avanços no processo analítico, nomeadamente na redução do volume de solvente necessário para o passo de retroextração efetuado num único passo, e diminuição do dispositivo analítico. Com estes novos melhoramentos, a tecnologia analítica possui maior versatilidade e a execução experimental tornou-se ainda mais rápida, simples e ambientalmente mais favorável, incluindo a vantagem no aumento do fator de enriquecimento e, permitindo alcançar limiares analíticos ainda mais baixos [18, 20, 22].

O presente estudo, propõe uma nova metodologia analítica, aplicando os novos conceitos da BA μ E [22], seguida da análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por rede de díodos (BA μ E- μ LD/HPLC-DAD) para a determinação de nove hormonas esteroides sexuais (estriol, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estrona, mestranol, 17 α -etinilestradiol, progesterona, 19-nortisterona e D-(-)-norgestrel) em matrizes reais. A figura 10.1 ilustra as estruturas químicas das nove hormonas seleccionadas para o presente estudo. A otimização da presente metodologia, incluindo a comparação de diversas fases sorventes (cinco ACs e cinco Ps) e interações químicas, assim como a influência de diversos parâmetros experimentais, é otimizada e discutida. A validação e aplicação da metodologia proposta totalmente otimizada, para a determinação das nove hormonas em amostras de água e urina, é igualmente avaliada.

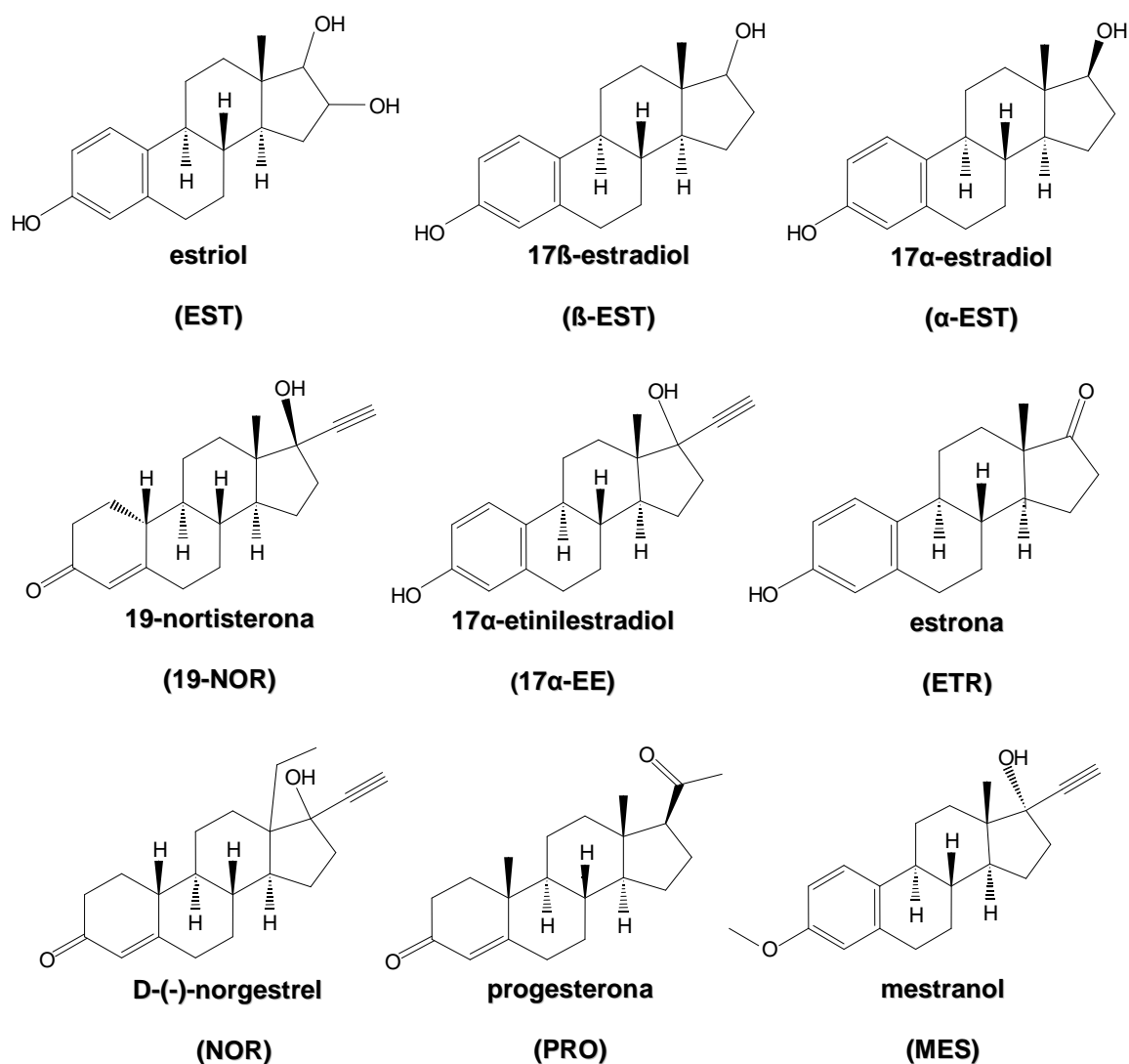


Figura 10.1 - Estruturas químicas das nove hormonas seleccionadas para o presente estudo.

10.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.2.1. Condições de operação instrumental

No presente estudo, foram selecionadas nove hormonas esteroides sexuais (EST, β -EST, α -EST, 19-NOR, 17 α -EE, ETR, NOR, PRO e MES) como compostos modelo (figura 10.1). Numa primeira fase, começou por se determinar as melhores condições de operação instrumental para as nove hormonas selecionadas, nomeadamente o tempo de retenção, espectro de absorção UV/vis, seletividade e resolução. Para o efeito, injetaram-se os padrões individuais de cada hormona e, posteriormente, padrões mistura constituídos por todas as hormonas. De acordo com os dados obtidos, selecionaram-se os comprimentos de onda de 200 e 240 nm, uma vez que correspondem ao máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) dos compostos modelo em estudo [3]. A fase móvel usada, era constituída por água e ACN, usando-se uma coluna cromatográfica de fase reversa (25 °C) através de eluição por gradiente, permitindo obter boa resposta instrumental no que respeita à resolução e seletividade para as nove hormonas em estudo, em tempo analítico aceitável (< 20 min).

Posteriormente, a sensibilidade instrumental foi determinada por intermédio dos LODs e LOQs, através da injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos das nove hormonas, calculados através de S/N igual a 3 e 10, respetivamente. Neste sentido, obtiveram-se valores compreendidos entre 8,0 e 15,0 $\mu\text{g/L}$ para os LODs e para os LOQs compreendidos entre 26,0 e 49,0 $\mu\text{g/L}$, para as nove hormonas em estudo. De seguida, a calibração instrumental foi efetuada com recurso à injeção de padrões de calibração constituídos pelas nove hormonas em estudo, abrangendo concentrações desde 50,0 a 9000,0 $\mu\text{g/L}$, num total de catorze níveis de concentração. Na gama de concentrações estudada, obtiveram-se boas linearidades para as nove hormonas, com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9998. A precisão instrumental, foi igualmente avaliada através da injeção consecutiva dos padrões de calibração, tendo-se obtido valores de RSD inferiores a 6,7 % (α -EST, 50 $\mu\text{g/L}$). A injeção de solvente isento de padrões, mostrou que não ocorriam efeitos de memória. Na tabela 10.1, estão resumidas as características dos analitos em estudo, nomeadamente $\log K_{OW}$ e pK_a , bem como todos os dados instrumentais

obtidos por HPLC-DAD, para as nove hormonas em estudo, sob condições instrumentais otimizadas.

Tabela 10.1 - Log K_{OW} , pK_a , tempos de retenção (t_R), comprimento de onda máximo ($\lambda_{m\acute{a}x}$), limiares analíticos (LODs e LOQs) e coeficientes de determinação (r^2) para as nove hormonas em estudo obtidos por HPLC-DAD, sob condições instrumentais otimizadas.

| Hormonas | log K_{OW} ^a | pK_a | t_R (min) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) | LODs (μg/L) | LOQs (μg/L) | $r^{2,e}$ |
|----------|---------------------------|--------------------|----------------|---------------------------------|----------------|----------------|-----------|
| EST | 2,81 | 10,38 ^b | 4,0 | 200 | 10,0 | 33,0 | 0,9998 |
| β-EST | 3,94 | 10,46 ^b | 9,0 | 200 | 8,0 | 26,0 | 0,9998 |
| α-EST | 3,94 | 10,33 ^d | 9,8 | 200 | 10,0 | 33,0 | 0,9999 |
| 19-NOR | 2,99 | 17,59 ^d | 10,3 | 240 | 15,0 | 49,0 | 0,9999 |
| 17α-EE | 4,12 | 10,40 ^b | 10,9 | 200 | 10,0 | 33,0 | 0,9999 |
| ETR | 3,43 | 10,34 ^b | 11,9 | 200 | 10,0 | 33,0 | 0,9999 |
| NOR | 3,48 | 17,91 ^d | 13,2 | 240 | 15,0 | 49,0 | 0,9999 |
| PRO | 3,67 | 18,92 ^d | 17,2 | 240 | 15,0 | 49,0 | 0,9999 |
| MES | 4,68 | 13,10 ^c | 19,6 | 200 | 8,0 | 26,0 | 0,9998 |

^a US EPA (2011) Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v. 4.1.

United States Environmental Protection Agency, Washington, DC;

^b [5];

^c [23];

^d [24];

^e Catorze níveis de concentração desde 50,0 a 9000,0 μg/L.

10.2.2. Estudo da eficiência da BAμE-μLD(100 μL)

No estudo e implementação de qualquer metodologia analítica, nomeadamente a presente que opera com recurso à tecnologia de amostragem por flutuação, é necessária a otimização de diversos parâmetros experimentais que podem afetar a eficiência da microextração das nove hormonas alvo, por forma a maximizar o desempenho analítico. Neste sentido, foram realizados ensaios sistemáticos por BAμE-LD em água ultrapura fortificada (6,0 μg/L) contendo os nove analitos modelo, para o estudo e seleção do material sorvente, tempo de extração e agitação, pH, força iónica e polaridade da matriz, assim como o tipo de solvente e tempo de retroextração, de acordo com trabalhos anteriores [3, 16-20, 22, 25, 26].

10.2.2.1. Caracterização das fases sorventes

O primeiro passo na fase de otimização, começou por se testar várias fases sorventes para revestimento da BAμE com propriedades físico-químicas distintas, que podem levar à obtenção da melhor eficiência possível em processos de enriquecimento analíticos, de acordo com outros trabalhos [16, 20, 22, 25, 26]. Entre os sorventes estudados, incluem-se cinco Ps (P1-P5) e cinco ACs (AC1-AC5), usados como fases sorventes de revestimento da BAμE com metade do comprimento, para a microextração das nove hormonas em água ultrapura. Relativamente aos cinco polímeros, são compostos por PS-DVB (P1 e P5), pirrolidona modificada (P2), troca catiónica/fase-reversa (P3), troca aniónica/fase-reversa (P4). Os polímeros testados, são caracterizados por terem tamanhos de partícula compreendidos entre 30 e 120 μm, tamanho de poro entre 80 e 85 Å e áreas superficiais entre 800 e 1200 m²/g, assim como grande estabilidade à variação de pH (0-14).

No que respeita aos ACs selecionados, apresentam áreas superficiais entre 900 e 1500 m²/g e pH_{PZC} de 6,4, 2,2, 8,4, 7,5 e 8,5, para AC1, AC2, AC3, AC4 e AC5, respetivamente. De acordo com estas propriedades, os referidos ACs apresentam características superficiais químicas distintas, desde ácidos a básicos, que podem ser decisivas para a eficiência da microextração das hormonas selecionadas.

Entre as nove hormonas esteroides sexuais em estudo, apresentam características de polares a apolares ($2,81 \leq \log K_{OW} \leq 4,68$), assim como características acídicas, uma vez que a forma molecular neutra é predominante para pHs inferiores a 8 [27], podendo estas características ser determinantes para os mecanismos de interação com as fases sorventes durante o processo de microextração.

10.2.2.2. Seletividade das fases sorventes

O primeiro passo, baseou-se na avaliação do desempenho analítico da BAμE-μLD(100 μL), testando diferentes fases sorventes para o revestimento do dispositivo de microextração, através da realização de ensaios com as nove

hormonas em água ultrapura sob condições experimentais padrão: extração - 25 mL (6,0 μ g/L), 1000 rpm, 3 e 16 h, pH 5,5; μ LD - ACN/MeOH (100 μ L), 30 min de tratamento ultrassónico. É de realçar, que no presente estudo foi usado o dispositivo com metade do comprimento (7,5 mm em comprimento e 3 mm em diâmetro) da BA μ E original, assim como usada metade da quantidade de fase sorvente, compreendidas entre 0,8 e 2,5 mg para os polímeros, e entre 0,9 e 1,6 mg para os ACs. A figura 10.2, mostra o perfil de resultados obtidos na comparação da seletividade das dez fases sorventes testadas por BA μ E, para as nove hormonas alvo em água ultrapura.

Em geral, a capacidade de sorção das fases sorventes está relacionada com a área superficial e estrutura porosa característica que cada sorvente apresenta. De igual modo, a força de sorção depende do pH da solução aquosa envolvente, uma vez que pode influenciar a carga superficial da fase sorvente, em particular para os ACs de acordo com o ponto de carga zero (pH_{PZC}) característico, bem como a forma molecular dos compostos em estudo, condicionando posteriormente os mecanismos de interação com os mesmos [28].

No caso dos ACs, estes são materiais sólidos de natureza porosa, que retêm os analitos através de interações electrostáticas e/ou dispersivas, de acordo com as propriedades texturais, área superficial e dimensão dos poros. Por outro lado, o pH_{PZC} dos ACs pode influenciar fortemente os mecanismos de interação envolventes com os analitos, onde as características ácidas e básicas da superfície dos ACs estão relacionadas com a composição superficial em oxigénio, azoto e hidrogénio, sendo determinante no processo de microextração dos ACs em solução [28]. Para o caso dos Ps testados, para além das propriedades físicas, vários mecanismos de interação podem ocorrer, nomeadamente de tipo π - π , dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio e interações iónicas, dependendo igualmente da área superficial e tamanho de partícula característica de cada polímero [28].

A figura 10.2.a, mostra o perfil de recuperações obtidas para os polímeros para 3 e 16 h de microextração, onde se verificam recuperações razoáveis para 3 h, e recuperações entre 90 e 100 % para 16 h, para todas as hormonas

usando o P2, à exceção do EST (> 60 %). O polímero P5 apresenta igualmente boa eficiência, embora um pouco abaixo da fase P2. Entre todos os polímeros testados, o sorvente P2 exibiu a melhor seletividade e eficiência, retendo os analitos em estudo com os mecanismos de interação mais fortes.

Por outro lado, a figura 10.2.b mostra o perfil de recuperações obtidas para os ACs testados, onde se verifica que o AC1 e AC2 apresentam melhor eficiência para as hormonas em estudo. Para os restantes ACs, o AC3 demonstra recuperações razoáveis para as 16 h, e AC4 e AC5 sempre recuperações inferiores a 30 %. De forma geral, a área superficial parece não ser determinante no processo de microextração, embora por outro lado o pH_{PZC} aparenta ser crítico no fenómeno de enriquecimento, influenciando os mecanismos de interação, e consequentemente as interações electroestáticas e/ou dispersivas são fortemente afetadas. Uma vez os AC3 e AC5 apresentarem características básicas, e AC4 características balanceadas entre básico e aproximadamente neutro, estas parecem ser electrostaticamente não favoráveis para o processo de microextração. Por outro lado, AC1 possui propriedades de ácido a neutro, enquanto AC2 possui propriedades acídicas, apresentando ambos vantagens na microextração das hormonas em estudo. Conforme já referido, o pH em solução pode ter forte influência nos mecanismos de interação electroestáticas e/ou dispersivas entre os ACs e os analitos em estudo, assim como na forma molecular das hormonas em solução, com variações entre a forma neutra e iónica. Deste modo, para os ACs em particular, sempre que uma determinada solução apresenta pH igual ao pH_{PZC} , a superfície do AC terá carga neutra, possuindo o mesmo número de cargas positivas e negativas. Para o caso do pH da amostra ser inferior ao pH_{PZC} , a carga superficial será positiva, e negativa se o pH da amostra for superior ao pH_{PZC} [17, 18, 29].

Dos dados obtidos, foi selecionado o P2 (pirrolidona modificada) para estudos posteriores, uma vez que mostrou a melhor eficiência para a microextração das hormonas selecionadas, quando comparado com outros sorventes, em condições experimentais idênticas.

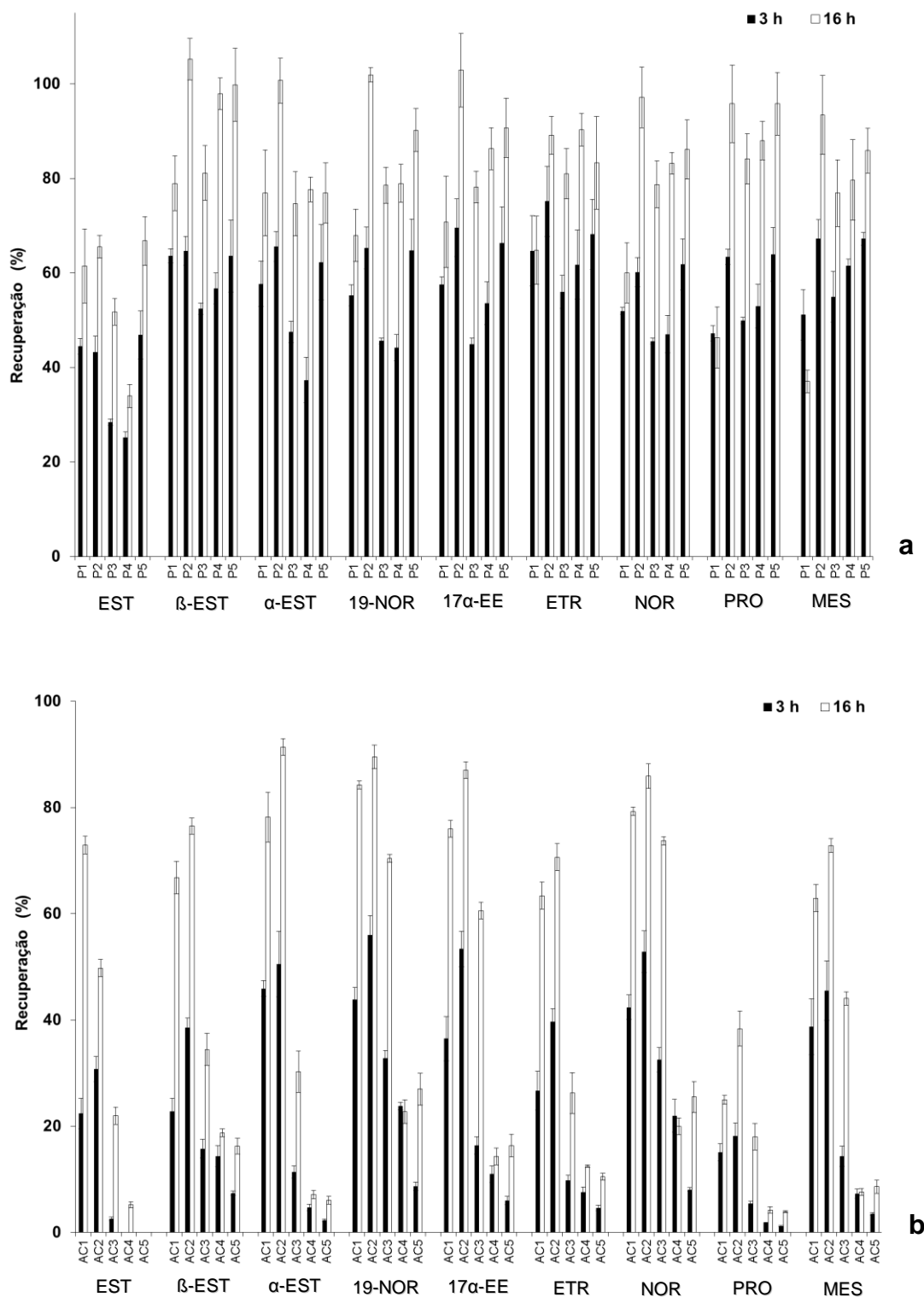


Figura 10.2 - Recuperação média obtida com diferentes Ps (a) e ACs (b) para as nove hormonas em estudo em água ultrapura por BA μ E- μ LD(100 μ L) /HPLC-DAD, em condições experimentais padrão. Condições - extração: 25 mL (6,0 μ g/L), 1000 rpm, 3/16 h, pH 5,5; μ LD: 100 μ L, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassónico.

10.2.2.3. Estudo do efeito dos parâmetros da μ LD(100 μ L)

No presente estudo, por forma a obter a máxima eficiência analítica para o passo da retroextração, usando somente 100 μ L de solvente adequado e executado num único passo, é necessário otimizar o processo da LD. Para o efeito, e após selecionar a melhor fase de revestimento para o enriquecimento das nove hormonas selecionadas através de BA μ E(P2, 1,3 mg), o passo seguinte consistiu na otimização do solvente mais adequado e o respetivo tempo de tratamento ultrassónico, por forma a obter as condições ideais que promovem a libertação completa das nove hormonas da fase sorvente.

Neste sentido, foram efetuados estudos sistemáticos em água ultrapura fortificada (6,0 μ g/L) por BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, no sentido de otimizar o solvente de retroextração (100 μ L), nomeadamente ACN, MeOH e mistura de ACN/MeOH (1:1, v/v). A figura 10.3, mostra o perfil de resultados obtidos para os solventes testados, onde se verifica que a mistura ACN/MeOH (1:1, v/v) apresenta vantagens na eficiência relativamente ao ACN e MeOH, tendo sido selecionado para prosseguir para estudos posteriores. De seguida, e uma vez o tempo de dessorção poder ser igualmente crítico, foram estudados os períodos de 15, 30, 45 e 60 min. Do perfil obtido para os tempos de retroextração estudados, verificou-se que 30 min foi suficiente para a obtenção da máxima eficiência no tratamento ultrassónico, tendo sido selecionado para estudos posteriores (dados não apresentados).

No sentido de averiguar eventuais retenções na BA μ E(P2) e/ou efeitos de memória ou *carryover*, foram efetuadas μ LD consecutivas das mesmas barras de microextração e injetadas no HPLC-DAD, tendo o ruído sido sempre inferior aos LODs instrumentais.

Através dos dados obtidos, pode afirmar-se que 100 μ L de solvente de dessorção mostrou ser eficiente no passo da retroextração, sendo imperativa a seleção do solvente mais adequado e do tempo ultrassónico necessário, por forma a alcançar a melhor eficiência no que respeita à remoção dos analitos da fase sorvente, assim como compatibilidade com o sistema de HPLC.

Dos resultados obtidos, serão utilizados para estudos posteriores 100 μ L da mistura ACN/MeOH (1:1, v/v) sob 30 min de tratamento ultrassônico.

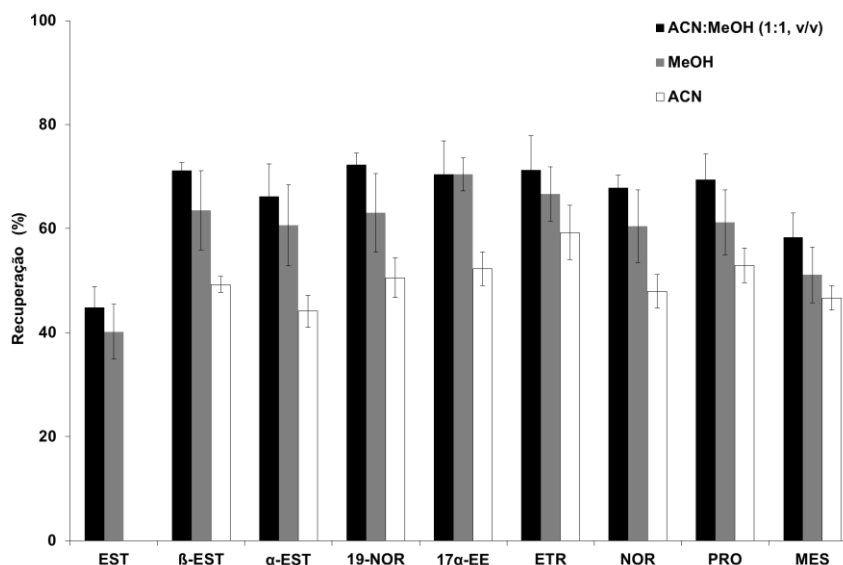


Figura 10.3 - Efeito do solvente na retroextração da BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD em água ultrapura para as nove hormonas em estudo. Condições - extração: 25 mL (6,0 μ g/L), 1000 rpm, 3 h, pH 5,5; μ LD: 100 μ L, 30 min de tratamento ultrassônico.

10.2.2.4. Estudo do efeito dos parâmetros da BA μ E(P2, 1,3 mg)

Durante o processo de microextração que opera através da tecnologia de amostragem por flutuação, alguns parâmetros que podem afetar o equilíbrio entre os analitos, a fase sorvente e a matriz aquosa, têm de ser otimizados. A velocidade de agitação, tem um papel importante na eficiência da microextração, uma vez que controla a difusão de transferência de massa dos analitos alvo para a fase sorvente, podendo limitar o processo analítico, em particular durante a microextração por flutuação. Deste modo, foram efetuados ensaios para testar as velocidades de 750, 1000 e 1250 rpm à temperatura ambiente. A figura 10.4 mostra o perfil obtido, onde se observa vantagem para 1250 rpm, tendo sido selecionado para os estudos posteriores.

De seguida, o tempo de equilíbrio foi igualmente estudado, o qual durante o enriquecimento através da tecnologia de amostragem por flutuação, a interação entre os analitos em solução e a fase de revestimento é baseada num processo de equilíbrio, o qual depende do tempo de exposição entre ambas as

fases envolvidas. O tempo de microextração influencia a distribuição entre os analitos em estudo em solução e a fase sorvente envolvida no processo, podendo ser decisivo na recuperação final da microextração das hormonas [16].

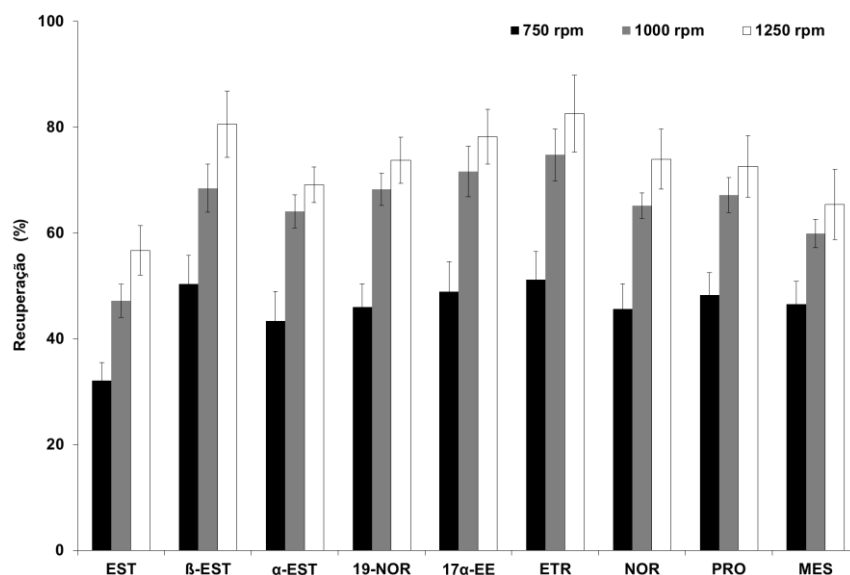


Figura 10.4 - Efeito da velocidade de agitação na eficiência da microextração das nove hormonas em estudo em água ultrapura por BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD. Condições - extração: 25 mL (6,0 μ g/L), 3 h, pH 5,5; μ LD: 100 μ L, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassónico.

Neste sentido, foram realizados ensaios para testar os tempos de 1, 2, 3 e 16 h à temperatura ambiente, para as nove hormonas seleccionadas. A figura 10.5.a, mostra o perfil obtido para os tempos de extração estudados, observando-se um aumento gradual na recuperação média entre a 1 e 16 h, tendo sido alcançada máxima recuperação entre 90 e 100 % nas 16 h de extração. Consequentemente, tempos de extração de 16 h foram seleccionados para estudos posteriores. No entanto, para o processo de otimização, nomeadamente o estudo do pH, polaridade e força iónica, foram usadas 3 horas para extração, no sentido de facilitar o tempo despendido nos ensaios.

O parâmetro a ser estudado posteriormente foi o efeito do pH da matriz na eficiência da BA μ E(P2, 1,3 mg) para as nove hormonas em estudo. O pH da matriz é um parâmetro de extrema importância, uma vez poder influenciar a forma molecular dos analitos alvo em solução para dissociado ou não dissociado, afetando diretamente a eficiência da fase P2 durante o processo de

microextração [16]. Deste modo, foram realizados ensaios em água ultrapura fortificados (6 μ g/L) através de BA μ E(P2, 1,3 mg), para testar pHs de 2,0, 5,5, 8,0 e 11,0, à temperatura ambiente. Pelo perfil de dados obtidos na figura 10.5.b, foi obtida melhor eficiência a pH 5,5 para as hormonas em estudo, tendo-se verificado ligeira redução a pH 2,0 e 8,0, e forte redução a pH 11,0. Uma vez que as hormonas em estudo se encontram na forma neutra a pH inferior a 8,0, para pHs superiores a forma iónica é predominante devido à reação de desprotonação, estando de acordo com o perfil de dados obtidos.

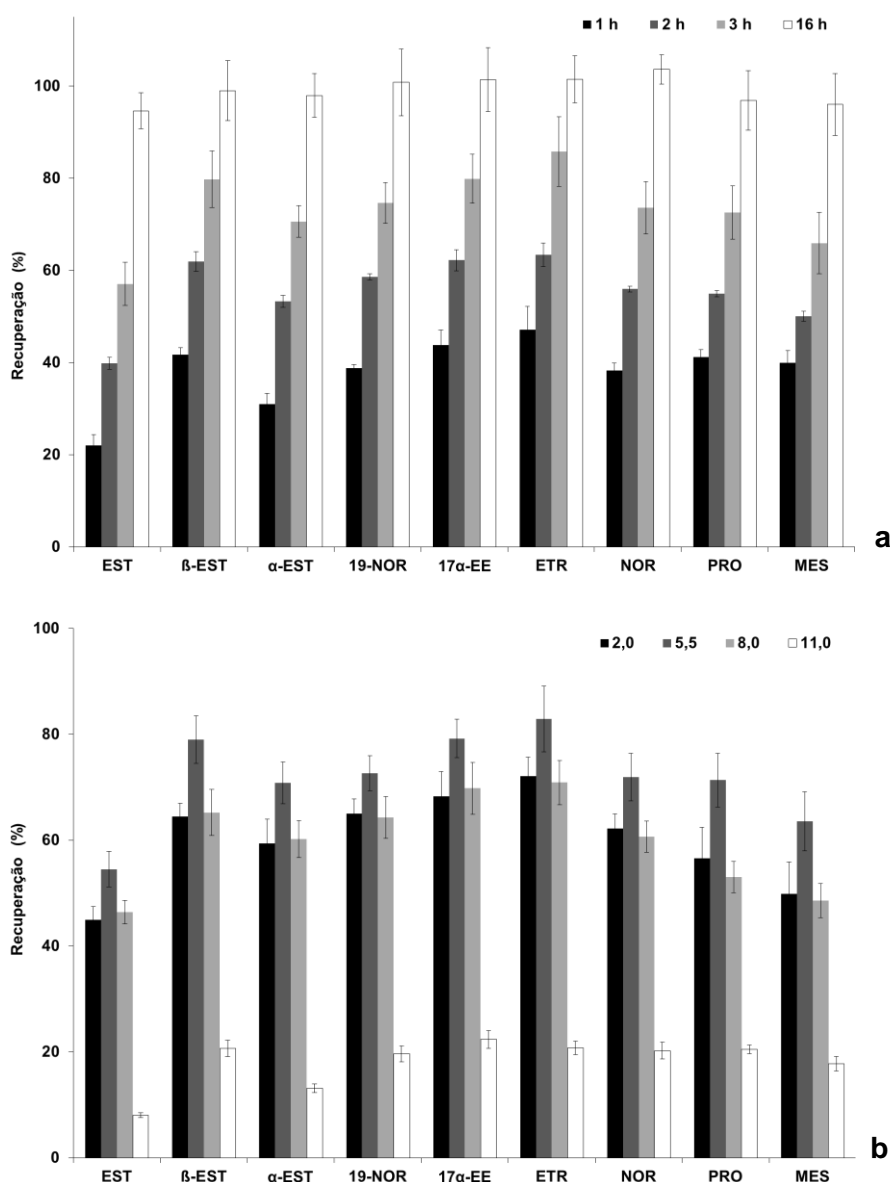


Figura 10.5 - Efeito do tempo de extração (a) e pH (b) na eficiência da microextração das nove hormonas em água ultrapura por BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD. Condições - (a) extração: 25 mL (6,0 μ g/L), 1250 rpm, pH 5,5; μ LD: 100 μ L, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassónico; (b) extração: 25 mL (6,0 μ g/L), 1250 rpm, 3 h; μ LD: 100 μ L, ACN/MeOH (1:1, v/v), 30 min de tratamento ultrassónico.

Deste modo, é notório o controlo do pH ser essencial, por forma a promover as interações das hormonas com a fase sorvente P2 e para aumento da eficiência, tendo sido selecionado o pH 5,5 para estudos posteriores.

De seguida, a força iónica foi estudada através da adição de um eletrólito, o que pode favorecer a migração dos compostos orgânicos em direção à fase sorvente e afetar a eficiência do processo de microextração, em particular para os compostos polares ($\log K_{OW} < 3$). Em geral, para aumento da eficiência dos analitos mais polares, a adição de sais é uma estratégia comum devido ao efeito de *salting-out*, o qual é baseado na redução da solubilidade dos analitos, promovendo a migração dos mesmos para a fase sorvente [3]. Neste sentido, foram realizados ensaios com a adição de NaCl com a percentagem de 0, 5, 10 e 15 % (p/v) em água ultrapura à temperatura ambiente. Do perfil obtido, foi observada ligeira redução na eficiência das hormonas em estudo, não apresentando qualquer vantagem no seu uso (dados não apresentados).

O último parâmetro a ser estudado foi a polaridade da matriz, a qual pode ser alterada ou controlada pela adição dum solvente orgânico, o qual elimina ou reduz o *wall-effect*. Este fenómeno, baseia-se na adsorção dos compostos com características mais hidrofóbicas nas paredes de vidro dos frascos de amostragem, o que pode reduzir a eficiência do processo de microextração [16]. Assim, foram realizados ensaios com a adição de MeOH com a percentagem de 0, 5, 10 e 15 % (v/v) em água ultrapura à temperatura ambiente. Do perfil de dados obtido, ocorreram reduções negligenciáveis para 17 α -EE, NOR, PRO e MES. No entanto, para o α -EST, 19-NOR e ETR ocorre pequena redução na recuperação para a adição de 10 e 15 % de MeOH, e uma forte redução na recuperação do EST e β -EST para a adição de 10 % de MeOH, sendo esta redução ainda mais acentuada para a adição de 15 % de MeOH (dados não apresentados). Assim, para estudos posteriores a metodologia proposta será desenvolvida sem a adição de NaCl e MeOH.

Neste contexto, após obtidas as condições experimentais otimizadas, apesar da presente metodologia necessitar de tempo de extração elevado (16 h) para atingir a máxima eficiência possível, o processo de microextração possui a

vantagem de poder ser executado durante a noite sem quaisquer condições especiais e sem a presença do operador.

10.2.3. Validação da metodologia BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD

Após estudados e otimizados os principais parâmetros que podem afetar o processo de microextração, por forma a maximizar o desempenho analítico da metodologia BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, estabeleceram-se as condições experimentais para prosseguir para a validação do método: BA μ E(P2, 1,3 mg) - 25 mL, 16 h, 1250 rpm, pH 5,5; μ LD - ACN/MeOH (1:1, v/v), 100 μ L, 30 min de tratamento ultrassónico. Posteriormente, para avaliar a eficiência da metodologia proposta, foram realizados ensaios em 25 mL de água ultrapura fortificada (6,0 μ g/L), sob condições experimentais otimizadas, tendo-se obtido eficiências médias desde 93,4 % (MES) a 100,7 % (α -EST), assim como boa precisão (RSD < 8,9 %). A sensibilidade da metodologia proposta, foi igualmente estudada através do cálculo dos limiares analíticos, tendo-se obtido LODs compreendidos entre 50,0 e 100,0 ng/L e LOQs entre 165,0 e 330,0 ng/L, determinados através de S/N igual a 3 e 10, respetivamente. A calibração da metodologia BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD foi efetuada em água ultrapura, numa gama de concentrações compreendidas entre 0,2 e 24,0 μ g/L para as hormonas em estudo, na qual se obteve boa linearidade com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9968 e precisão (RSD) inferior a 13,5 % (1,0 μ g/L, PRO; 2,0 μ g/L e 4,0 μ g/L, MES). A tabela 10.2, resume os dados referentes à recuperação experimental média obtida, limiares analíticos, gama de concentrações estudada e coeficientes de determinação (r^2), para as nove hormonas esteroides em estudo pela metodologia BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

Tabela 10.2 - Recuperação média, limiares analíticos, gama linear dinâmica e coeficientes de determinação para as nove hormonas em estudo, através do método BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

| Hormonas | Recuperação ^a (\pm RSD) | LODs (ng/L) | LOQs (ng/L) | Gama (μ g/L) | r^2 |
|-----------------|--|----------------|----------------|----------------------|--------|
| EST | 95,3 \pm 3,0 | 100,0 | 330,0 | 0,4-24,0 | 0,9976 |
| β -EST | 97,9 \pm 5,2 | 50,0 | 165,0 | 0,2-24,0 | 0,9994 |
| α -EST | 100,7 \pm 7,5 | 50,0 | 165,0 | 0,2-24,0 | 0,9994 |
| 19-NOR | 100,4 \pm 3,1 | 80,0 | 265,0 | 0,3-24,0 | 0,9993 |
| 17 α -EE | 97,8 \pm 6,4 | 70,0 | 230,0 | 0,3-24,0 | 0,9981 |
| ETR | 100,6 \pm 4,8 | 70,0 | 230,0 | 0,3-24,0 | 0,9972 |
| NOR | 99,1 \pm 6,4 | 100,0 | 330,0 | 0,4-24,0 | 0,9968 |
| PRO | 96,8 \pm 8,3 | 100,0 | 330,0 | 0,4-24,0 | 0,9980 |
| MES | 93,4 \pm 8,9 | 80,0 | 265,0 | 0,3-24,0 | 0,9968 |

^a 6,0 μ g/L, n=3;

A figura 10.6 apresenta um cromatograma relativo a um ensaio de recuperação em água ultrapura fortificada (6,0 μ g/L) composto pelas nove hormonas em estudo, através de BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas, onde é observado bom desempenho analítico.

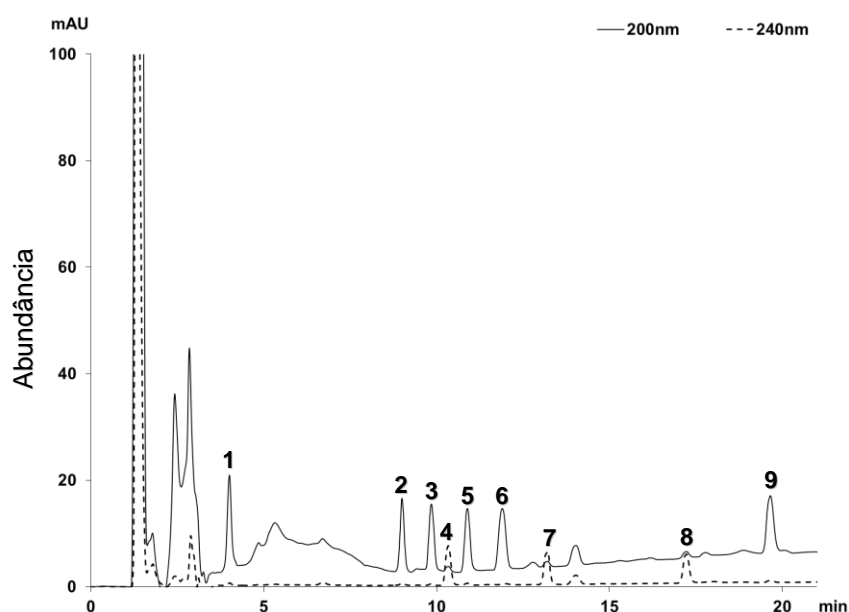


Figura 10.6 - Cromatograma referente a ensaio de recuperação em água ultrapura fortificada (6,0 μ g/L), obtido por BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 1-EST, 2- β -EST, 3- α -EST, 4-19-NOR, 5-17 α -EE, 6-ETR, 7-NOR, 8-PRO, 9-MES.

De seguida, foram igualmente efetuados estudos para avaliar a repetibilidade, através de ensaios realizados no mesmo dia (três ensaios) e em cinco dias diferentes (quinze ensaios) para a metodologia proposta. Assim, para o efeito foram realizados ensaios em água ultrapura fortificados ao nível de 2,0, 8,0, 12,0 e 16,0 $\mu\text{g/L}$ em triplicado e no mesmo dia, e ao nível de 6,0 $\mu\text{g/L}$ em triplicado e em cinco dias diferentes. A tabela 10.3 resume os resultados obtidos para os ensaios de repetibilidade, através da metodologia BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μL)/HPLC-DAD. No que respeita à eficiência média obtida nos ensaios de repetibilidade no mesmo dia, foi obtida boa concordância nas recuperações médias, estando compreendidas entre 86,9 % (MES, 2,0 $\mu\text{g/L}$) e 101,6 % (19-NOR, 16,0 $\mu\text{g/L}$) para as concentrações testadas, assim como boas precisões (RSD) compreendidas entre 2,7 % (β -EST, 16,0 $\mu\text{g/L}$) e 13,8 % (MES, 2,0 $\mu\text{g/L}$). Relativamente à repetibilidade realizada em cinco dias diferentes, nos ensaios efetuados em água ultrapura fortificada (6,0 $\mu\text{g/L}$), foram obtidas recuperações compreendidas entre $89,2 \pm 11,0$ % (MSF) e $101,4 \pm 7,4$ % (α -EST).

Em resumo, usando o dispositivo BA μ E(P2, 1,3 mg), combinado com a redução de solvente ao nível dos 100 μL no passo da retroextração, a presente metodologia demonstrou excelente desempenho analítico. Todavia, a sensibilidade analítica da metodologia proposta BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μL)/HPLC-DAD, operando através da tecnologia de amostragem por flutuação, pode ser melhorada usando um sistema de HPLC acoplado à espectrometria de massa ou sistemas *tandem* (LC-MS ou LC-MS/MS), reduzindo consideravelmente os LODs e sendo importante na identificação inequívoca dos analitos em estudo, em particular no estudo de matrizes de complexidade elevada. Quando a presente metodologia é comparada com outros métodos sortivos, nomeadamente SBSE(PDMS), apresenta eficiências superiores [3].

Tabela 10.3 - Recuperações médias e precisões (% \pm RSD), obtidas nos ensaios de repetibilidade no mesmo dia e em dias diferentes, em água ultrapura por BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD para as nove hormonas, sob condições experimentais otimizadas.

| Hormonas | Recuperação (% \pm RSD) | | | | |
|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--|
| | Repetibilidade ^a | | | | Repetibilidade em dias diferentes ^b |
| | 2,0 μ g/L | 8,0 μ g/L | 12,0 μ g/L | 16,0 μ g/L | 6,0 μ g/L |
| EST | 101,9 \pm 5,5 | 94,5 \pm 8,4 | 96,1 \pm 6,9 | 97,0 \pm 5,1 | 97,2 \pm 4,3 |
| β -EST | 93,2 \pm 7,3 | 98,3 \pm 5,5 | 96,8 \pm 4,6 | 100,5 \pm 2,7 | 97,6 \pm 5,6 |
| α -EST | 100,6 \pm 6,3 | 99,0 \pm 8,5 | 94,2 \pm 5,5 | 99,4 \pm 4,7 | 101,4 \pm 7,4 |
| 19-NOR | 100,0 \pm 5,6 | 96,8 \pm 3,0 | 93,0 \pm 9,5 | 101,6 \pm 2,8 | 98,2 \pm 5,7 |
| 17 α -EE | 101,2 \pm 6,3 | 99,4 \pm 6,1 | 93,6 \pm 5,4 | 96,6 \pm 4,6 | 97,4 \pm 9,9 |
| ETR | 91,4 \pm 6,3 | 100,5 \pm 3,6 | 100,8 \pm 4,9 | 95,6 \pm 6,3 | 101,2 \pm 7,7 |
| NOR | 89,6 \pm 8,8 | 95,7 \pm 4,9 | 91,0 \pm 8,3 | 94,3 \pm 8,3 | 94,4 \pm 11,3 |
| PRO | 89,2 \pm 10,4 | 95,0 \pm 4,5 | 90,9 \pm 8,8 | 95,2 \pm 10,3 | 90,4 \pm 12,3 |
| MES | 86,9 \pm 10,2 | 94,8 \pm 5,0 | 90,6 \pm 13,8 | 95,2 \pm 6,9 | 89,2 \pm 11,0 |

^a n = 3;

^b n = 15 em cinco dias consecutivos.

10.2.4. Aplicação da metodologia BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD a matrizes reais

Após terminada o passo da validação do método, a aplicação da presente metodologia a matrizes reais, é um passo imprescindível por forma a demonstrar a capacidade analítica da metodologia BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD. Deste modo, a metodologia proposta que opera através da tecnologia de amostragem por flutuação, foi aplicada em matrizes diversas, nomeadamente água subterrânea, estuarina, marinha e residual, bem como em amostras biológicas, nomeadamente urina. Estes ensaios são de grande importância, por forma a conhecer os níveis das hormonas em estudo no ambiente aquático, e por outro lado, para traçar o perfil dos níveis destas hormonas no organismo humano, bem como para uma correta interpretação biomédica de possíveis alterações metabólicas. Assim, o objetivo da aplicação da presente metodologia, mostrou não só a capacidade da mesma, mas também no sentido de

diagnosticar possíveis perturbações do sistema endócrino. Dado que a maioria das amostras reais apresenta elevada complexidade, recorre-se usualmente ao SAM por forma a minimizar eventuais efeitos de matriz, sendo igualmente adequada para quantificação das nove compostos alvo e a melhor estratégia analítica para o efeito [16-18, 20, 22].

Para o caso das amostras de água testadas, foram efetuados ensaios por BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD com recurso ao SAM, fortificando as amostras reais com quatro níveis de concentração desde 4,0 a 16,0 μ g/L constituídos pela mistura das nove hormonas em estudo, efetuando igualmente o ensaio em branco sem qualquer fortificação (C_0). A tabela 10.4 resume os resultados obtidos por SAM nas matrizes reais estudadas, sob condições experimentais otimizadas. Nas amostras de água estudadas, não foram detetados quaisquer vestígios dos analitos em estudo nas águas subterrânea e marinha. No entanto, foram detetados β -EST, 17 α -EE e ETR, contendo respetivamente, $0,30 \pm 0,02$ μ g/L, $4,30 \pm 0,30$ μ g/L e $0,80 \pm 0,06$ μ g/L na água estuarina, assim como $0,80 \pm 0,07$ μ g/L, $0,80 \pm 0,02$ μ g/L e $1,30 \pm 0,03$ μ g/L na água residual. Relativamente aos coeficientes de determinação obtidos para as águas, estão compreendidos entre 0,9934 (19-NOR e NOR) e 0,9995 (17- α EE).

Tabela 10.4 - Coeficientes de determinação e níveis de concentrações detetados para as nove hormonas em estudo obtidos através do SAM nas matrizes reais estudadas, através de BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

| | Água subterrânea | Água estuarina | Água mar | Água Residual | U | U _P |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|----------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Hormonas | r^2 | | | | | |
| EST | 0,9960 | 0,9951 | 0,9945 | 0,9937 | 0,9939 | 0,9973 |
| β -EST | 0,9942 | 0,9986 | 0,9989 | 0,9989 | 0,9990 | 0,9975 |
| α -EST | 0,9944 | 0,9977 | 0,9987 | 0,9993 | 0,9976 | 0,9966 |
| 19-NOR | 0,9991 | 0,9971 | 0,9934 | 0,9962 | 0,9932 | 0,9941 |
| 17 α -EE | 0,9972 | 0,9993 | 0,9971 | 0,9995 | 0,9983 | 0,9975 |
| ETR | 0,9945 | 0,9990 | 0,9972 | 0,9988 | 0,9965 | 0,9972 |
| NOR | 0,9970 | 0,9934 | 0,9965 | 0,9993 | 0,9951 | 0,9940 |
| PRO | 0,9966 | 0,9981 | 0,9959 | 0,9990 | 0,9973 | 0,9945 |
| MES | 0,9965 | 0,9936 | 0,9949 | 0,9988 | 0,9957 | 0,9936 |
| Hormonas | Conteúdo (μ g/L \pm DP) | | | | | |
| EST | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | 230,0\pm7,6 |
| β -EST | < LOD | 0,30\pm0,02 | < LOD | 0,80\pm0,07 | 15,0\pm0,6 | 215,0\pm17,4 |
| α -EST | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | 18,0\pm1,0 | 30,0\pm1,7 |
| 19-NOR | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |
| 17 α -EE | < LOD | 4,30\pm0,30 | < LOD | 0,80\pm0,02 | 68,0\pm2,9 | < LOD |
| ETR | < LOD | 0,80\pm0,06 | < LOD | 1,30\pm0,03 | 38,0\pm2,7 | 103,0\pm6,8 |
| NOR | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |
| PRO | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | 145,0\pm7,3 |
| MES | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |

U - Urina de mulher;

U_P - Urina de mulher grávida.

A figura 10.7, mostra um cromatograma que corresponde à sobreposição parcial de ensaios não fortificados, realizados na água estuarina e residual, obtida por BA μ E(P2, 1.3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas, onde foram detetados alguns dos analitos em estudo.

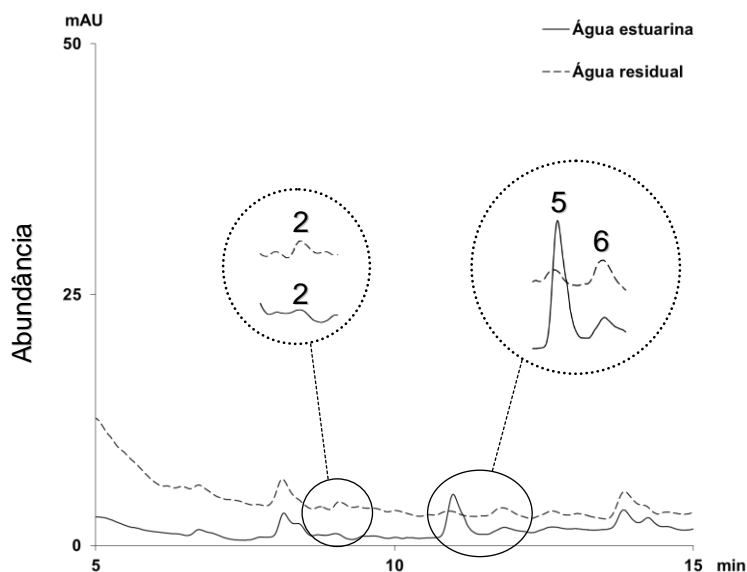


Figura 10.7 - Sobreposição de cromatogramas referentes aos ensaios não fortificados efetuados em água estuarina e água residual, obtidos pelo SAM por BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Legenda: 2- β -EST, 5-17 α -EE, 6-ETR.

Posteriormente, a presente metodologia foi aplicada em amostras de urina. A maioria das hormonas esteroides no organismo humano, são excretadas na totalidade na forma conjugada (glucoradas e/ou sulfatadas) pelos rins, e não na sua forma parente, isto é, na forma molecular original, a qual é inferior a 10 %. Apesar de haver estudos que relatam somente a quantificação das hormonas não conjugadas [3] em urina, para uma quantificação total, é necessário um protocolo nas quais a urina é digerida, para reverter as hormonas conjugadas à sua forma molecular parente. Para uma quantificação total das hormonas na urina, os métodos normalmente adotados são a hidrólise ácida ou a enzimática. No presente estudo, adotou-se a hidrólise ácida, uma vez que está relatada como sendo a de mais simples e rápida execução [9]. Para o caso das amostras de urina testadas, foram efetuados ensaios por BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD com recurso ao SAM, fortificando as amostras com quatro níveis de concentração compreendidas entre 8,0 e 20,0 μ g/L constituídos pela mistura das nove hormonas em estudo, efetuando igualmente o ensaio em branco C₀ (sem fortificação). O primeiro caso em estudo correspondeu à urina (U) de uma mulher jovem, cujo procedimento está descrito na parte experimental. Dos resultados obtidos presentes na tabela 10.4, foram detetados β -EST, α -EST,

17 α -EE e ETR, com níveis de $15,0 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$, $18,0 \pm 1,0 \mu\text{g/L}$, $68,0 \pm 2,9 \mu\text{g/L}$ e $38,0 \pm 2,7 \mu\text{g/L}$, respetivamente. Pelos resultados obtidos, podemos afirmar que esta mulher consumia comprimidos de controlo gestacional, uma vez o 17 α -EE ter sido detetado na urina. Relativamente aos coeficientes de determinação obtidos, estes foram superiores a 0,9932. A segunda urina (U_P) a ser estudada, correspondeu à de uma mulher grávida de 29 semanas. Os resultados obtidos encontram-se presentes na tabela 10.4, onde foram detetados EST, β -EST, α -EST, ETR e PRO, com níveis de $230,0 \pm 7,6 \mu\text{g/L}$, $215,0 \pm 17,4 \mu\text{g/L}$, $30,0 \pm 1,7 \mu\text{g/L}$, $103,0 \pm 6,8 \mu\text{g/L}$ e $145,0 \pm 7,3 \mu\text{g/L}$, respetivamente. Os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 0,9936.

Em resumo, foram obtidos bons resultados analíticos para todas as amostras estudadas, apresentando coeficientes de determinação compreendidos entre 0,9932 (19-NOR, U) e 0,9995 (17 α -EE, residual).

10.3. CONCLUSÕES

No presente estudo, a metodologia proposta, BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, usando um dispositivo com dimensões reduzidas e revestido com um polímero de pirrolidona para microextração, em combinação com diminuição do volume de solvente na LD num único passo, foi desenvolvida, otimizada, e validada para a monitorização simultânea de nove hormonas esteroides sexuais (EST, β -EST, α -EST, 19-NOR, 17 α -EE, ETR, NOR, PRO e MES) em matrizes reais.

Nas condições experimentais otimizadas, o procedimento proposto demonstrou excelente desempenho analítico, incluindo elevada seletividade e sensibilidade, boa eficiência, precisão adequada ao nível dos ppt's e boa gama linear dinâmica. A aplicação do SAM à metodologia desenvolvida em matrizes reais, nomeadamente amostras de água e urina, demonstrou igualmente bom desempenho analítico.

A presente metodologia, BA μ E(P2, 1,3 mg)- μ LD(100 μ L)/HPLC-DAD, que opera através da tecnologia de amostragem por flutuação, demonstrou ser uma

excelente alternativa para a análise das nove hormonas esteroides, a qual permitiu seleccionar a fase sorvente mais adequada aos analitos em estudo, permitindo aumentar o fator de enriquecimento para níveis de concentração residuais.

10.4. REFERÊNCIAS

1. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Determination of Steroid Sex Hormones in Real Matrices by Bar Adsorptive Microextraction (BAμE). *Talanta* (2014). *In press*. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.11.013.
2. Ying, G.-G.; Kookama, R. S.; Ru, Y.-J.; Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* 28 (2002) 545-551.
3. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 1303-1311.
4. Ciofi, L.; Fibbi, D.; Chiuminatto, U.; Coppini, E.; Checchini, L.; del Bubba, M.; Fully-automated on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis at sub-ng/L levels of selected estrogens in surface water and wastewater. *Journal of Chromatography A* 1283 (2013) 53-61.
5. Chen, B.; Huang, Y.; He, M.; Hu, B.; Hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples. *Journal of Chromatography A* 1305 (2013) 17-26.
6. Guo, F.; Liu, Q.; Qu, G.-B.; Song, S.-J.; Sun, J.-T.; Shi, J.-B.; Jiang, G.-B.; Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1281 (2013) 9-18.
7. Tienport, B.; David, F.; Desmet, K.; Sandra, P.; Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS applied to biological fluids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 (2002) 46-55.
8. Wang, H.-X.; Wang, B.; Zhou, Y.; Jiang, Q.-W.; Rapid and sensitive analysis of phthalate metabolites, bisphenol A, and endogenous steroid hormones in human urine by mixed-mode solid-phase extraction, dansylation, and ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 4313-4319.

9. Mao, L.; Sun, C.; Zhang, H.; Li, Y.; Wu, D.; Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride. *Analytica Chimica Acta* 522 (2004) 241-246.
10. Pacáková, V.; Loukotková, L.; Bosáková, Z.; Štulík, K.; Analysis for estrogens as environmental pollutants - A review. *Journal of Separation Science* 32 (2009) 867-882.
11. Suzuki, Y.; Matuyama, T.; Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge. *Water Research* 40 (2006) 1061-1069.
12. Wang, S.; Xu, Z.; Fang, G.; Zhang, Y.; He, J.; Separation and determination of estrone in environmental and drinking water using molecularly imprinted solid phase extraction coupled with HPLC. *Journal of Separation Science* 31 (2008) 1181-1188.
13. Hu, Y.; Fan, Y.; Li, G.; Preparation and evaluation of a porous monolithic capillary column for microextraction of estrogens from urine and milk samples online coupled to high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1228 (2012) 205-212.
14. Kawaguchi, M.; Ishii, Y.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Inoue, K.; Saito, K.; Nakazawa, H.; Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry in the multi-shot mode for determination of estrogens in river water samples. *Journal of Chromatography A* 1049 (2004) 1-8.
15. Neng, N. R.; Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F.; Adsorptive micro-extraction techniques - Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7303-7310.
16. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction - Application to trace level analysis of fungicides in real matrices. *Journal of Chromatography A* 1265 (2012) 7-16.
17. Almeida, C.; Stępkowska, A.; Alegre, A.; Nogueira, J. M. F.; Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A*, 1311 (2013) 1-10.
18. Almeida, C.; Strzelczyk, Rafał; Nogueira, J. M. F.; Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique - Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices. *Talanta*, 120 (2014) 126-134.
19. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 1355-1364.

20. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases. *Journal of Chromatography A* 1348 (2014) 17-26.
21. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.; Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separation* 11 (1999) 737-747.
22. Almeida, C.; Ahmad, S.; Nogueira, J. M. F.; Advances on Bar Adsorptive MicroExtraction (BA μ E) Technique - Application for the determination of pharmaceuticals in real matrices. Submitted, 2014.
23. Quintana, J. B.; Carpinteiro, J.; Rodríguez, I.; Lorenzo, R. A.; Carro, A. M.; Cela, R.; Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1024 (2004) 177-185.
24. www.chemaxon.com
25. Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) with in situ derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 3155-3163.
26. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices. *Talanta* 83 (2011) 1643-1649.
27. www.chemicalize.org
28. Nogueira, J. M. F.; Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta* 757 (2012) 1-10.
29. Neng, N. R.; Mestre, A. S.; Carvalho, A. P.; Nogueira, J. M. F.; Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibric acid in environmental and biological matrices. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6263-6270.

CAPÍTULO 11

**CONCLUSÕES FINAIS E
PERSPETIVAS FUTURAS**

11. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

A presente tese propõe a aplicação de metodologias analíticas inovadoras para a microextração vestigial de compostos emergentes, em particular de fungicidas, benzofenonas, inseticidas repelentes, parabenos, fármacos e hormonas esteroides sexuais, em diversos tipos de matrizes reais.

O trabalho desenvolvido baseou-se no uso da técnica de microextração adsortiva em barra (BA μ E) para enriquecimento vestigial, operando com recurso à tecnologia de amostragem por flutuação, e que apresenta a vantagem de se poder seleccionar a fase sorvente mais adequada para cada aplicação em particular. Dependendo dos analitos em estudo, e aproveitando as diferentes propriedades físico-químicas de inúmeras fases, foram testados e seleccionados diversos sorventes poliméricos (ex. poliestireno-divinilbenzeno, pirrolidona modificada, troca catiónica, troca aniónica, etc.) e materiais sólidos nanoestruturados (ex. carvões ativados).

Neste contexto, desenvolveram-se diversas metodologias com recurso à BA μ E como técnica baseada na microextração sortiva estática, seguida de retroextração com recurso a dessorção líquida (LD) e combinação com técnicas cromatográficas e hífenadas modernas, tendo-se desenvolvido, inovado, otimizado e validado os procedimentos analíticos, assim como aplicado a diversos tipos de amostras ambientais, alimentares, biológicas e produtos comerciais.

Numa primeira fase, demonstraram-se todas as potencialidades da técnica BA μ E-LD, usando diversos sorventes para microextração cuidadosamente seleccionados, tendo-se aplicado em combinação com LVI-GC-MS(SIM) e HPLC-DAD na monitorização de dez fungicidas (azoxistrobina, difenoconazol, metalaxil, miclobutanil, penconazol, tebuconazol, flusilazol, ciprodinil, procimidona e benalaxil) e quatro filtros-UV de tipo benzofenona (benzofenona, 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona, 2,4-hidroxibenzofenona e 4-hidroxi-benzofenona), respetivamente. A aplicação destas duas novas metodologias a matrizes reais, nomeadamente na determinação vestigial de fungicidas em diversos tipos de águas e vinhos, e de benzofenonas em águas,

urina e produtos cosméticos, provou excelente desempenho analítico com elevada seletividade e sensibilidade na gama dos ppb's a ppt's, assim como uma alternativa credível comparativamente com outras técnicas estáticas de microextração sortiva.

Uma vez a etapa da retroextração ser limitativa, incluindo os passos de evaporação e troca de solvente, foram posteriormente introduzidos melhoramentos em todo o processo analítico. Neste sentido, avaliou-se a etapa de retroextração numa única etapa, eliminando os passos de evaporação e de troca de solvente com simultânea redução do volume de solvente (1,5 mL \rightarrow 200 μ L), tendo-se ainda proposto, em ensaios preliminares, a diminuição do tamanho do dispositivo analítico (15 mm \rightarrow 7,5 mm) usado na BA μ E. Para avaliar o desempenho analítico destes melhoramentos, foram estudados três inseticidas repelentes (*N,N*-dietil-*meta*-toluamida, *cis*-permetrina e *trans*-permetrina) e quatro parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno) em combinação com LVI-GC-MS(SIM) e HPLC-DAD, respetivamente, em amostras de diverso tipo de água, assim como em urina e produtos cosméticos. Os resultados obtidos demonstraram que as inovações introduzidas não comprometiam nem o processo de microextração nem o de retroextração, apresentando excelentes eficiências e precisões adequadas para análise vestigial. Se a redução do volume de solvente para retroextração demonstrou excelente desempenho analítico, ficou igualmente provado que o uso do dispositivo com metade em tamanho e em quantidade de sorvente disponível, não comprometia a microextração analítica, não tendo sido observados decréscimos na eficiência e obtido sensibilidades na gama dos ppb's a ppt's. Para além do exposto, os melhoramentos introduzidos tornaram o procedimento analítico ainda mais expedito, com maior facilidade de manipulação e ambientalmente ainda mais favorável.

Uma vez o dispositivo miniaturizado (7,5 mm) ter apresentado elevado desempenho analítico, foi posteriormente testada uma redução ainda maior do volume de solvente na retroextração (200 μ L \rightarrow 100 μ L), na tentativa porém de reduzir ainda mais os limiares analíticos face ao aumento do fator de enriquecimento que daí advém. No sentido de avaliar este avanço, foram desenvolvidas novas metodologias analíticas para a análise de seis fármacos

(furosemida, mebeverina, cetoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ácido mefenâmico) e nove hormonas esteroides sexuais (estriol, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estrona, mestranol, 17 α -etinilestradiol, progesterona, 19-nortisterona e D-(-)-norgestrel). Os resultados obtidos em ambas as metodologias desenvolvidas permitiram alcançar limiares analíticos ainda mais baixos (ppt's), o que se mostrou notável tendo em consideração que foram ambas combinadas com o sistema convencional de HPLC-DAD. Neste sentido, os avanços introduzidos demonstraram excelente desempenho analítico, com eficiências e precisões adequadas, quando aplicadas na análise de amostras em diversos tipos de água e urina.

As eficiências obtidas em algumas das metodologias propostas, foram igualmente comparadas com outros métodos de enriquecimento baseados em sorção, em particular a bem estabelecida extração sortiva em barra de agitação revestida com polidimetilsiloxano (SBSE(PDMS)), tendo demonstrado vantagens inequívocas, não necessitando de estratégias secundárias, como é o caso por vezes do recurso a agentes de derivatização, para além de demonstrar grande apetência para a monitorização de compostos com características mais polares.

Em resumo, o presente trabalho científico demonstra que a BA μ E quando aplicada analiticamente, com todos os melhoramentos introduzidos no processo analítico, se apresenta como uma técnica estática de microextração sortiva muito reproduzível, de fácil e rápida implementação experimental, baixo custo, e ambientalmente favorável, sendo seletiva e sensível em análise vestigial e abrangente para a monitorização multiresíduo de diversas classes de compostos emergentes, sendo indicada para responder a matrizes reais com elevada complexidade e origem diversa.

Como perspetivas futuras, propõe-se o desenvolvimento e aplicação da tecnologia aqui proposta a outras classes de compostos emergentes, no sentido de alargar ainda mais a área de atuação. Sugere-se ainda testar novas fases sorventes, com características físico-químicas distintas para aumento da seletividade e/ou sensibilidade, assim como materiais resultantes da modificação química com propriedades superficiais e texturais inovadoras. Outras

possibilidades poderão surgir através do uso por exemplo de líquidos iónicos como fases para microextração, assim como na aplicação de fases mistas, na qual a mistura homogénea de sorventes com propriedades distintas atuem de forma sinérgica, tirando partido conjunto das características específicas de cada material em particular.

Poderá igualmente equacionar-se a redução do volume de amostra a ser usado, uma vez que para muitos tipos de matrizes, o volume disponível ser, por vezes, escasso, tirando partido da miniaturização ainda mais acentuada das inovações introduzidas no dispositivo de microextração aqui proposto.

Por fim, a possibilidade de combinação com sistemas hifenados, nomeadamente LC-MS, *tandem* (LC-MS/MS) ou mesmo com instrumentação de alta resolução, apresenta-se sempre como uma alternativa a considerar, no sentido do incremento substancial quer da sensibilidade quer da seletividade, fundamentalmente na identificação inequívoca de analitos desconhecidos em matrizes que evidenciem complexidade elevada.

ANEXO

ANEXO 1

A.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Os métodos cromatográficos são constituídos por técnicas de análise poderosas, com elevada aplicação e que têm ganho espaço em todos os ramos da ciência. Os avanços alcançados nas últimas décadas nestas tecnologias, faz com que estas técnicas possuam uma poderosa capacidade de separação de amostras reais constituídas por misturas com elevada complexidade [1].

A.1.1. Breve nota histórica

A cromatografia é um termo aplicado a uma série de técnicas de separação, nas quais os constituintes da amostra a serem separados, são distribuídos entre uma fase estacionária (FE), que pode ser líquida, sólida ou um gel, e uma fase móvel (FM) insolúvel na estacionária, que pode ser gasosa, líquida ou um fluido supercrítico que interatua com a primeira [1, 2].

Os primeiros apontamentos em cromatografia surgiram em 1897, quando David Talbot Day demonstrou que uma determinada terra era capaz de fracionar uma amostra de petróleo, através da alteração da composição. O seu avanço na matéria revelou-se sem grande sucesso, uma vez que, apesar da divulgação dos seus resultados, não teve capacidade de definir corretamente o fenómeno, atribuindo somente como tendo potencial analítico. Em 1903, o botânico russo Michael S. Tswett apresentou os primeiros estudos sobre o assunto e definiu corretamente o processo, atribuindo-lhe o nome atualmente existente. Os trabalhos de Tswett, basearam-se no estudo de pigmentos vegetais, concretamente a clorofila, passando-os numa coluna empacotada com carbonato de cálcio. A separação teve lugar pelo aparecimento de várias bandas coloridas. Alguns anos mais tarde, nos finais dos anos trinta e finais de quarenta, surgiram novos desenvolvimentos, quando Izmailov e Schraiber introduziram a cromatografia em camada fina (1938), sendo mais tarde melhorada por Stahl em 1958. Martin e Synge desenvolveram a cromatografia em fase gasosa (GC) de partição em 1941, tendo ganho o prémio Nobel em 1957 [1-3].

Inicialmente, a cromatografia líquida era realizada em colunas de vidro com diâmetro alargado e operando à pressão atmosférica sob gravidade, sendo a análise lenta e o procedimento laborioso. No final da década de 60, foi dada maior atenção ao desenvolvimento da cromatografia em fase líquida, como técnica complementar ao GC,

quando surgiu a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Com todos os esforços desenvolvidos para a evolução da GC e HPLC, sobretudo ao nível da instrumentação e colunas cromatográficas, tal como hoje a conhecemos, ambas as técnicas apresentam potencialidades ao nível da separação fina. Ainda hoje, as técnicas cromatográficas continuam em franco desenvolvimento, sendo usadas e aceites como técnicas para análise de rotina em diversas áreas, nomeadamente, a química, biologia, médica, farmacêutica, ambiental e controlo de qualidade, entre outras [4].

A.1.2. Conceitos teóricos fundamentais

Em cromatografia, o sucesso da separação de uma mistura de compostos envolve o compromisso entre resolução cromatográfica, capacidade da amostra e tempo de análise. Numa separação cromatográfica, a amostra introduzida é transportada pela FM, interagindo com a FE ao ser forçada a passar pela mesma na qual é imiscível, e encontrando-se suportada geralmente numa coluna. A eluição de cada componente da mistura injetada é conseguida através da otimização da velocidade de fluxo da FM, a qual realiza o transporte e proporciona a interação dos componentes da amostra com a fase estacionária. A FM e a FE são escolhidas de modo a que os componentes da amostra se distribuam entre ambas com afinidades diferentes, ou seja, têm em conta as propriedades de todas as partes envolvidas no processo, permitindo assim alcançar melhor eficiência na separação. A separação numa coluna cromatográfica, depende do grau de interação dos analitos com ambas as fases, e que pode ser definida por uma constante de distribuição. Esta relação define a transferência de massa que ocorre entre ambas as fases, e que resulta da respetiva interação. Assim, para um dado analito X estabelece-se o equilíbrio do analito ($X_{FM} \rightleftharpoons X_{FE}$) entre a FM e a FE, com a respetiva constante distribuição ou coeficiente de partição (K) de acordo com a expressão:

$$K = \frac{[X]_{FE}}{[X]_{FM}} \quad (1)$$

onde $[X]_{FE}$ é a concentração do analito X na FE e $[X]_{FM}$ é concentração do analito X na FM.

O tempo de retenção (t_R) é um parâmetro com grande importância em cromatografia, uma vez que define o grau de interação ou afinidade do analito entre ambas as fases. O t_R é definido como o tempo que um dado analito necessita para

percorrer todo o trajeto da coluna desde a injeção até ser detetado, enquanto o tempo de retenção ajustado (t_R') é o tempo que um analito despende apenas na FE. Por outro lado, designa-se por tempo morto (t_M) o tempo que uma espécie demora a percorrer a FM não apresentando qualquer tipo de interação com a FE. A figura A1.1 ilustra estes dois conceitos num cromatograma típico.

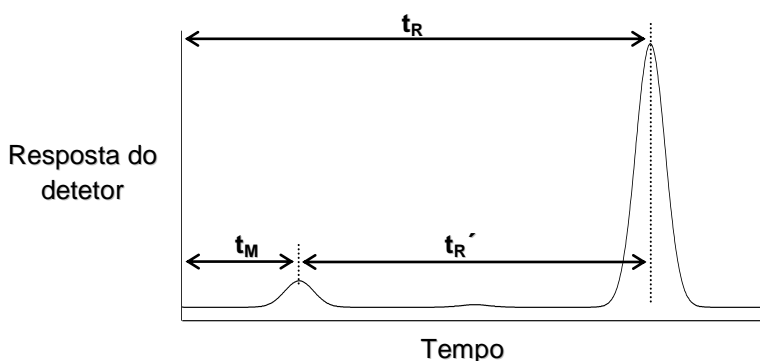


Figura A1.1 - Ilustração do tempo morto (t_M), retenção ajustado (t_R') e do tempo de retenção (t_R) num cromatograma.

Para os componentes muito retidos, isto é, que apresentam elevada interação com a FE, deslocam-se mais lentamente com o fluxo da FM e, conseqüentemente, vão apresentar um t_R elevado. Por outro lado, componentes muito pouco retidos, ou com baixa interação com a fase estacionária, deslocam-se rapidamente com a FM e vão apresentar um t_R baixo. A velocidade de migração de um analito num sistema cromatográfico pode igualmente ser definido por outro parâmetro denominado fator de capacidade (k') ou fator de retenção ajustado, que pode ser definido por:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M} \quad (2)$$

Este parâmetro relaciona o t_R' com o t_M , indicando-nos se a análise é lenta ou rápida. Conseqüentemente, para valores reduzidos de k' os componentes são pouco retidos na FE da coluna, enquanto para valores elevados de k' os componentes da mistura são fortemente retidos, originando tempos de análise elevados.

A seletividade (α), é outro parâmetro importante em cromatografia, podendo ser definida para dois analitos (1 e 2) adjacentes através da expressão:

$$\alpha = \frac{t_R(2) - t_M}{t_R(1) - t_M} = \frac{t'_R(2)}{t'_R(1)} \quad (3)$$

em que $t_R(1)$ e $t_R(2)$ são os tempos de retenção dos analitos 1 e 2, respetivamente, e $t'_R(1)$ e $t'_R(2)$ são os tempos de retenção ajustados dos analitos 1 e 2, respetivamente. Considerando que o analito 2 é o mais fortemente retido na fase estacionária, α irá possuir sempre um valor superior ou igual à unidade. Os parâmetros de retenção ou termodinâmicos são assim muito importantes em técnicas cromatográficas.

O transporte dos analitos na coluna cromatográfica, é influenciado por diversos fenómenos de transferência de massa, o que pode ser determinante na eficiência do processo de separação. Assim, parâmetros cinéticos como a velocidade do fluxo do eluente, o tamanho e empacotamento das partículas da coluna, a viscosidade do solvente, o comprimento da coluna, etc, são decisivos no processo cromatográfico. A forma mais simples de definir a eficiência de uma coluna é através da introdução do conceito “abstrato” de prato teórico e correspondente altura equivalente (H). Prato teórico pode então ser definido como o segmento de coluna onde é atingido, a cada instante, o equilíbrio do analito a ser analisado entre a FM e a FE. Assim, a eficiência, parâmetro cinético, pode ser calculado pela seguinte expressão:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (4)$$

onde N representa o número de pratos teóricos, sendo a relação proporcional ao comprimento da coluna, t_R é o tempo de retenção de um determinado analito, W a respetiva largura na base do pico simétrico e $W_{1/2}$ a largura a meia altura usada para picos assimétricos. Esta relação considera que todos os picos têm comportamento ou forma Gaussiana, mas na prática nem todos a apresentam. O número de pratos teóricos é válido somente para as condições experimentais específicas, isto é, o número de pratos teóricos calculado para um determinado composto que elui mais cedo é o mesmo que um que elua mais tarde.

Por H entende-se como o comprimento da coluna no qual um equilíbrio termodinâmico foi atingido, podendo ser calculado pela seguinte expressão:

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

onde L é o comprimento da coluna e N o número de pratos teóricos. N é assim um parâmetro importante para avaliar a eficiência duma coluna cromatográfica. Elevadas eficiências, ou seja, N elevado, significa que os picos obtidos serão finos e podemos estar em presença de alta resolução, onde será sempre mais fácil a separação completa dos analitos envolvidos.

Ao nível teórico ou num caso ideal, a largura dos picos ou bandas deveria ocorrer em cerca de um segundo. No entanto, a largura tende a ser maior devido a uma série de processos de transporte de massa, os quais alteram a velocidade de migração das moléculas dos compostos no interior da coluna cromatográfica. Assim, o alargamento das bandas ocorre fundamentalmente, devido a múltiplos caminhos tomados pelos analitos ao longo dos interstícios das partículas da FE da coluna, a fenómenos de difusão molecular longitudinal que podem ocorrer na FM, bem como a efeitos de resistência à transferência de massa entre ambas as fases.

O principal objetivo da cromatografia, baseia-se na resolução ou separação completa dos componentes duma amostra em tempo considerado razoável e com a obtenção de picos ou bandas simétricas. Consequentemente, a resolução (R_s) é um parâmetro de extrema importância em cromatografia, uma vez que define o grau de separação entre dois analitos adjacentes, podendo ser calculada por intermédio da associação de N , α e k' , através da seguinte expressão:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right) \quad (6)$$

Refira-se que, para que ocorram separações completas entre dois picos adjacentes, a R_s tem forçosamente de ser superior ou igual a 1,5. A R_s pode ser incrementada por alteração da seletividade da coluna e/ou de parâmetros operacionais. No entanto, se a eficiência da coluna for constante, só é incrementada através do aumento do comprimento da coluna aumentando, consequentemente, o tempo de análise.

Os processos de separação cromatográfica, podem ser classificados de acordo com a natureza do mecanismo de distribuição (partição, adsorção, etc.) entre a mistura de analitos e os sucessivos equilíbrios atingidos em cada momento durante o percurso na coluna cromatográfica entre a FE e a FM. Podem ser igualmente divididos, de acordo com o tipo de FM usada (gasosa, líquida ou fluído supercrítico) e o suporte da FE (coluna ou leito aberto) [1-6]. A figura A1.2 resume a classificação dos métodos cromatográficos mais vulgarmente usados em química analítica.

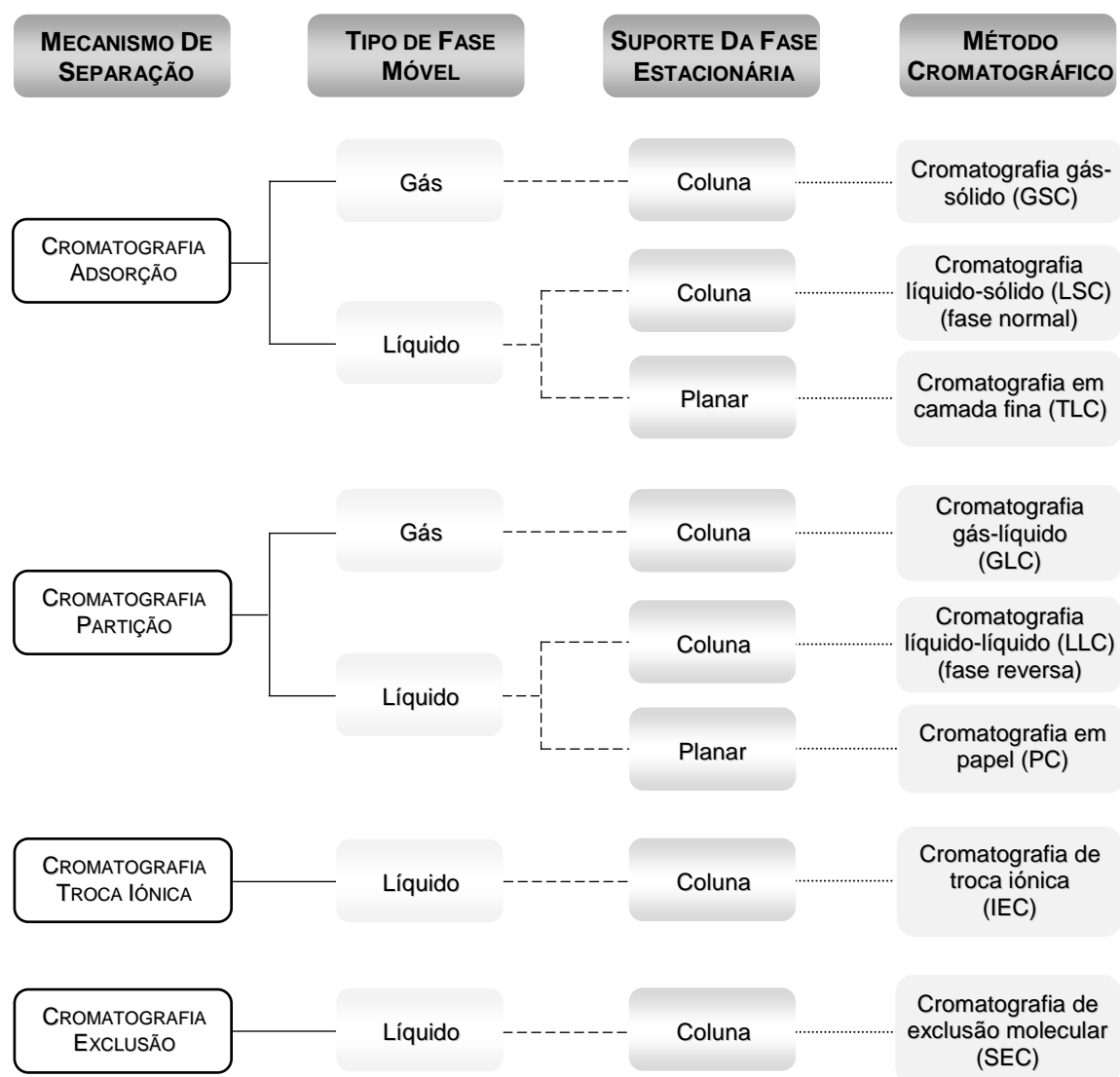


Figura A1.2 - Classificação dos métodos cromatográficos mais comuns.

A.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida é referida quando a FM é um líquido, tendo começado por ser usada no seu início em forma de coluna clássica, onde o eluente percorre a mesma por ação da gravidade. No entanto, esta metodologia apresentava diversas limitações, sendo trabalhosa e necessitando de grande tempo de análise [4].

Atualmente, um sistema moderno de HPLC consiste num conjunto de módulos sofisticados, com características próprias e absolutamente necessárias para uma execução conveniente, como mostra a figura A1.3.

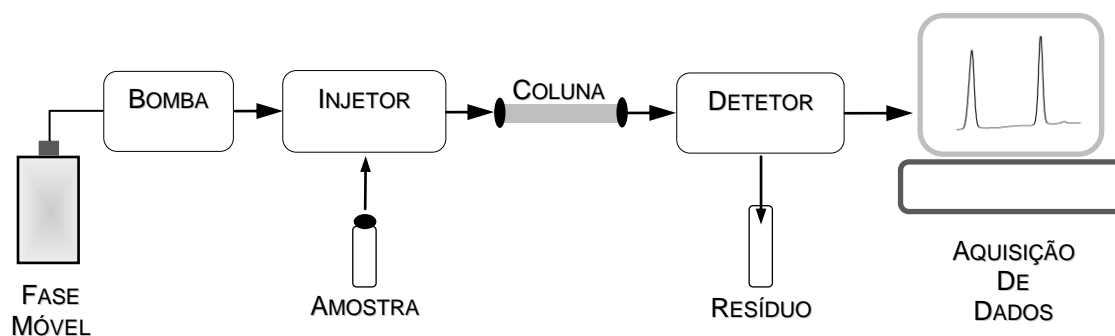


Figura A1.3 - Ilustração simplificada de um sistema de HPLC.

Estes instrumentos caracterizam-se por terem como principais componentes os recipientes contendo o eluente ou a FM, um sistema de bombeamento dos mesmos, sistema de desgaseificação, sistema de injeção da amostra manual/automática (injetor), compartimento para a coluna cromatográfica com forno termostatizado incorporado, sistema de detecção e software adequado para o registo e tratamento dos dados analíticos. Um equipamento de HPLC pode possuir até quatro frascos, nos quais se introduz a FM. É aconselhável que antes de qualquer análise todos os eluentes a serem utilizados sejam previamente filtrados. No entanto, nas extremidades dos tubos imersos em cada reservatório responsáveis pelo transporte da FM, existe um filtro poroso que filtra a mesma de modo a evitar que partículas sólidas entrem no sistema de HPLC, danificando a bomba, o sistema de injeção, ou mesmo entupindo lentamente a coluna cromatográfica ou os capilares, o que normalmente resulta em problemas instrumentais sérios. A FM ao ser bombeada para a coluna atravessa uma unidade de desgaseificação, uma vez gases dissolvidos podem originar a formação de bolhas no sistema cromatográfico, perturbando quer a coluna e a respetiva separação cromatográfica, quer a estabilidade do sinal do detetor. As análises cromatográficas por HPLC podem ser efetuadas mantendo a composição da fase móvel constante ou variável, designando-se por eluição isocrática ou por gradiente, respetivamente. O eluente pode conter dois, três ou mesmo quatro solventes distintos, que podem diferir entre si no que respeita à polaridade e composição, sendo normalmente usadas bombas recíprocas operando em sistema quaternário [1-6].

No sistema de injeção da amostra, a mesma é feita com o auxílio de válvulas especiais, levando a resultados analíticos com grande precisão e exatidão. Existem dois modos de injeção; na injeção stop-flow o fluxo de solvente é parado por momentos e só depois dum ajuste da coluna a amostra é injetada para a mesma; o modo de injeção

mais usado em HPLC consiste no sistema de loops, o qual integra os instrumentos de cromatografia líquida e que, atualmente, se encontram perfeitamente automatizados, libertando o operador para outras tarefas laboratoriais [1, 2].

A coluna cromatográfica é onde ocorre a separação dos analitos constituintes da amostra, sendo normalmente construídas em aço inoxidável e desenvolvidas para suportar pressões elevadas. As colunas possuem geralmente um comprimento compreendido entre 5 e 25 cm, sendo que o tamanho comum é de 10 a 15 cm. O diâmetro interno comum está compreendido entre 2 a 5 mm, com tamanhos de partículas entre 2 e 5 μm . Dependendo do tipo de análise ou amostras a estudar, o uso de pré-colunas é prática comum, sendo colocadas antes da coluna analítica e têm como finalidade aumentar o tempo de vida da mesma, restando purezas indesejadas. Estes instrumentos podem possuir um termóstato ou forno para que a temperatura de operação passe a ser regulada e se mantenha constante. O tipo de enchimento a utilizar numa coluna para HPLC, vai depender em grande parte do tipo de substâncias a introduzir no sistema. O enchimento das colunas pode ter características polares, classificada de fase normal, ou características não polares, classificada de fase reversa. A separação por fase reversa é das mais usadas em HPLC, sendo que na atualidade o seu uso é muito abrangente. Para conferir características apolares às fases estacionárias, são introduzidos grupos alquila através de reações específicas, onde normalmente grupos com dois, quatro, oito, dezoito, ou até mais átomos de carbono estão ligados quimicamente a partículas de sílica [1-6].

O detetor é um componente essencial em HPLC, uma vez que converte uma mudança de concentração na fase móvel num sinal, sendo registado por um processador de dados através de software adequado, podendo por vezes ser designado como o “olho” do sistema cromatográfico. A interpretação destes dados produz resultados qualitativos e quantitativos sobre os componentes de uma amostra. Dependendo da natureza das substâncias a separar, o detetor a utilizar deve ser selecionado para cada caso. Em cromatografia líquida os detetores convencionais não são universais, sendo por isso necessário utilizar o detetor mais adequado à natureza das substâncias a analisar. Um detetor sensível, seletivo e preciso é aquele que produz o maior sinal por unidade de concentração do constituinte da amostra em igualdade de condições de operação, possui a característica de medir um determinado composto em detrimento de outro e produz ou dá a mesma resposta, ou seja, é repetível para uma determinada concentração. Existem disponíveis no mercado diversos tipos de detetores para HPLC, sendo os mais utilizados o detetor de ultravioleta-visível (UV/Vis) com λ fixo

e variável, e de rede de díodos (DAD) com varrimento espectral simultâneo. Outros detetores podem ser de fluorescência, eletroquímicos, condutividade, dispersão de luz e mesmo por hifenação a espectrometria de massa (MS) [1-6].

A.1.4. Cromatografia em fase gasosa (GC)

Tal como em qualquer processo cromatográfico, a GC é uma técnica muito usada para diversas aplicações na atualidade. No entanto, no caso particular da GC, a FM é um gás inerte que força a amostra introduzida a passar por uma FE com a qual é imiscível, que se encontra fixada numa coluna. A eluição de cada componente é conseguida através do fluxo do gás que não interatua com os componentes da amostra, tendo somente como função o transporte dos mesmos. Este caso particular da cromatografia, é denominada por cromatografia gás-líquido (GLC) quando a FE é líquida e gás-sólido (GSC) quando é sólida. Genericamente, um cromatógrafo de GC é constituído por três módulos essenciais, que são o injetor, a coluna colocada no interior dum forno e o detetor. Todo o sistema é controlado por software adequado através de um computador. Os gases normalmente utilizados como FM, são o hélio, azoto e hidrogénio. No que respeita à introdução da amostra, existem vários tipos de injetores em GC. Numa injeção típica, a amostra líquida ao ser introduzida no injetor, é vaporizada e misturada com o gás de arraste, empurrando os componentes da mistura para a coluna onde se efetua a separação cromatográfica. Entre os modos de injeção existentes, os mais usados são os modos por temperatura constante (isotérmica), com (split) ou sem (splitless) repartição da amostra e o modo de vaporização com temperatura programada (PTV). O injetor split/splitless é o modo de injeção mais convencional. A seleção depende essencialmente do objetivo da análise, condicionada pelo teor do analito na amostra. Por intermédio dum sistema de válvulas, no modo split somente uma parte da amostra é arrastada para a coluna, o que torna este modo indicado para amostras em que a concentração dos analitos é elevada (> ppm). No modo splitless, a amostra é arrastada na totalidade para a coluna cromatográfica, sendo adequada para análise vestigial (< ppm). A percentagem de repartição é definida no software e depende de cada caso em particular. Neste modo, a temperatura do injetor é definida por forma a promover a vaporização do solvente da amostra e os analitos. O volume de injeção usado neste tipo de injetor, é normalmente compreendida entre 0,2 e 2,0 µL. Na injeção no modo PTV, o injetor é arrefecido por um líquido criogénico (ex. azoto), a temperaturas que genericamente podem estar compreendidas entre 0 e 40 °C, sendo a amostra posteriormente injetada. Após a injeção e evaporação do solvente, a

câmara do injetor é subitamente aquecida a temperaturas elevadas e os analitos da amostra transferidos quantitativamente para a coluna onde ocorre a separação cromatográfica. A grande vantagem deste injetor está no volume de injeção que permite usar, que tipicamente pode ir até 100 μL , aumentando substancialmente a sensibilidade. No que respeita à coluna a usar em GC, existem dois tipos distintos, normalmente as colunas de empacotamento e as colunas capilares. Desde a década de 1980, o uso das colunas de empacotamento decaiu de forma acentuada, e somente em alguns casos particulares ainda são usadas. Por outro lado, as colunas capilares foram substituindo as de empacotamento devido à sua elevada resolução que apresentam, o que é decisivo quando se pretende separar misturas com elevado grau de complexidade [1, 2, 7]. A figura A1.4 ilustra de uma forma simplificada, os principais componentes num sistema instrumental de GC.

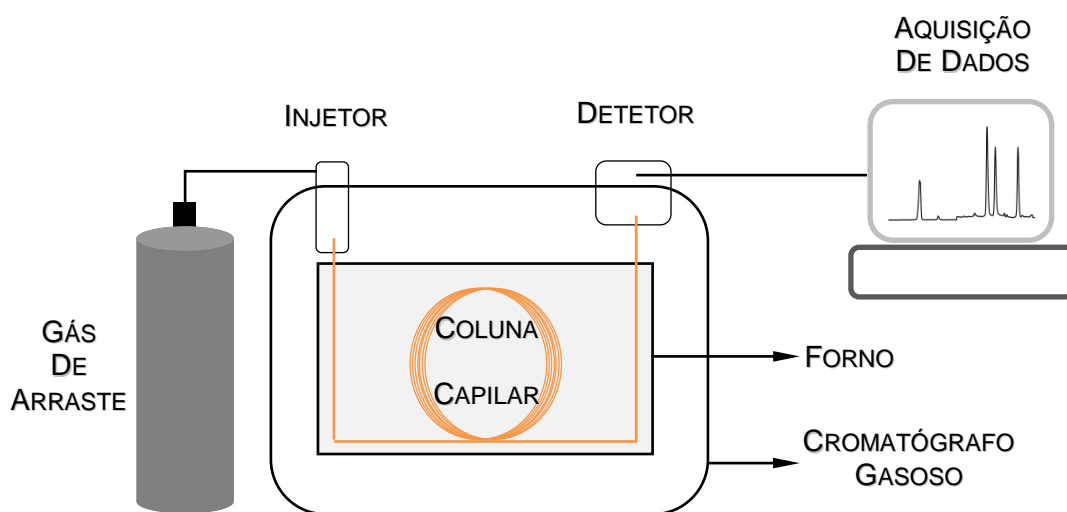


Figura A1.4 - Ilustração simplificada de um sistema de GC.

As colunas capilares são geralmente constituídas por um tubo de sílica fundida, com a parede interna revestida por um filme de FE. A superfície externa é revestida com uma película de poliimida, que confere elasticidade e robustez à coluna capilar, sobretudo devido às elevadas temperaturas de operação. As fases estacionárias existentes são numerosas, as quais podem ter características apolares, semi-polares e polares. As fases estacionárias líquidas mais vulgarmente usadas, são as constituídas à base de silicone, as quais apresentam grande estabilidade térmica numa alargada gama de temperaturas. Entre estas, as mais comuns e que abrangem um alargado número de aplicações, são as colunas constituídas por fases estacionárias à base de polidimetilsiloxano (PDMS), possuindo características apolares [5, 8]. As dimensões das

colunas capilares, podem abranger diâmetros internos compreendidos entre 0,10 e 0,53 mm e comprimentos de 10 a 60 m. O uso duma coluna capilar adequada para a separação cromatográfica é decisivo. No entanto, a temperatura à qual a coluna vai operar é tanto ou mais importante, e é neste aspeto que o forno onde a coluna está instalada num cromatógrafo é preponderante para a separação dos constituintes de misturas complexas, uma vez que as interações entre os analitos e a FE dependerem da mesma. As análises em GC podem operar no modo isotérmico ou por intermédio de uma ou várias rampas de temperatura, nas quais ocorre aumento progressivo constante ou aumento térmico a diferentes velocidades e tempos distintos com possibilidade de etapas isotérmicas no início, meio ou no fim da análise. O último modo de operacionalidade térmica é o mais usual, nomeadamente para análises de misturas complexas contendo compostos com volatilidades muito distintas. Um outro componente essencial na operação de um sistema de GC é o detetor. À medida que a FM transporta os analitos e chegam ao detetor, este é responsável pela emissão do sinal, traduzindo a variação da resposta em função da composição e/ou propriedades dos componentes eluídos. Idealmente, um detetor deve possuir várias características, nomeadamente sensibilidade adequada, estabilidade, reprodutibilidade, resposta linear ao soluto numa gama abrangente de concentrações, elevada operacionalidade de gama de temperaturas, resposta rápida, entre outras. Não existindo detetores ideais, entre os existentes, destacam-se o de ionização de chama, de azoto-fósforo, condutividade térmica e de captura eletrónica. Apesar da resposta destes detetores ser específica para determinado grupo ou classe particular de analitos, a resposta a cada analito é limitada. Dependendo de cada aplicação, estes detetores permitem a pesquisa de analitos conhecidos, sendo a identificação efetuada baseada no tempo de retenção de cada componente. Atualmente, é possível combinar a técnica de GC a outro instrumento analítico como é o caso da espectrometria de massa (MS), sendo que esta hifenação oferece numa só análise possibilidades analíticas acrescidas no que respeita à sensibilidade, seletividade e identificação individual de cada componente em amostras desconhecidas [1, 2, 4, 5, 7, 8].

A.1.5. Cromatografia em fase gasosa - Espectrometria de massa (GC-MS)

A hifenação GC-MS oferece possibilidades na identificação qualitativa, quantitativa, mas igualmente estrutural de analitos presentes em amostras desconhecidas. Atualmente, é uma técnica de uso generalizado e usada diariamente em diversas áreas, como a ambiental, forense, médica, alimentar, industrial, entre outras.

Esta associação sinérgica de duas técnicas poderosas, junta a elevada capacidade da GC na separação de amostras complexas, com a elevada potencialidade da MS em fornecer informação estrutural de cada componente presente. Após a separação cromatográfica ocorrer na coluna cromatográfica, todo o efluente gasoso atravessa uma interface, a qual faz a ligação entre o GC e o MS. A interface situa-se precisamente à saída da coluna do GC e estende-se à entrada do MS, onde está localizada a fonte de ionização do MS. A interface é normalmente um tubo metálico, que se encontra a uma temperatura elevada (ex. 280 °C). A fase gasosa que elui do GC e atravessa a interface, entra no MS na câmara de ionização, sendo normalmente usada ionização eletrónica ou eletroionização, a qual bombardeia os constituintes vaporizados com um feixe de eletrões energéticos (70 eV). Neste processo, ocorre a ionização das moléculas com consequente quebra de ligações químicas e formação de fragmentos iónicos mais pequenos relativamente à molécula original. Uma pequena percentagem da molécula original absorve assim energia suficiente para a perda dum eletrão, originando o ião molecular e correspondentes fragmentos gerados, sendo acelerados na direção do analisador. Nesta secção, a separação de todos os iões gerados, é efetuada através da razão massa/carga (m/z) de cada fragmento que atravessa o analisador. Entre os tipos de analisadores existentes, destaca-se o quadrupólo, a armadilha de iões (ion trap) e o de tempo de voo. Entre estes, o quadrupólo é o de mais baixo custo, robusto, versátil e de grande simplicidade, representando cerca de 90 % dos sistemas de GC-MS mais usados a nível mundial, operando no entanto a baixa resolução. Os iões ao atravessarem o analisador são dirigidos para o detetor, normalmente um multiplicador de eletrões, que transforma e emite num sinal a variação de composição dos iões que o atingem. Este produz correntes de amplificação com baixo ruído de fundo e tempo de resposta rápido. O seu funcionamento tem como base a emissão secundária de eletrões, isto é, quando um ião atinge a sua superfície, libertam-se eletrões que vão novamente colidir na superfície, e assim continuamente, até atingir um amplificador que produz um sinal. Este sinal origina o denominado traçado de corrente iónica, ou simplesmente um gráfico representando a abundância de cada analito detetado em função do tempo de retenção. Para além disto, há a acrescentar a informação espectral típica de cada analito, isto é, o espectro de massa que corresponde à abundância de cada ião em função de m/z [7-9]. Há dois modos de operação num sistema GC-MS, denominados de full-scan (FS) ou varrimento contínuo, e de iões selecionados (SIM). No modo FS, o espectrómetro de massa analisa todos os iões com uma gama abrangente de m/z , detetados e registados. Este modo de operação é genericamente usado na análise de amostras desconhecidas, sendo particularmente útil para identificação dos analitos e caracterização das mesmas. Para tal, recorre-se

normalmente a bibliotecas espectrais de referência (Wiley Mass Spectral Library, NIST, etc.). No modo de operação SIM, e de acordo com a informação espectral prévia e característica de cada composto, são selecionados até três íons característicos para cada analito. Os íons selecionados devem ser baseados, essencialmente, na sua abundância e especificidade. No modo SIM, o ganho em sensibilidade e seletividade é muito elevado comparando com o FS, uma vez que o espectrómetro de massa monitoriza somente os íons pré-selecionados dentro dum intervalo de tempo previamente escolhido e de acordo com o tempo de retenção de cada analito. Devem ser evitados íons que estejam presentes como interferentes com um tempo de retenção perto dos analitos em estudo e os que podem resultar da deterioração da FE da coluna. Este modo é especialmente útil quando se pretende efetuar análise quantitativa de analitos alvo em concentrações vestigiais, dado os baixos limites alcançados, obtendo-se elevado ganho em sensibilidade e seletividade [7, 8].

A.2. REFERÊNCIAS

1. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; Principles of Instrumental Analysis. Thomson/Brooks/Cole, 2007.
2. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; Analytical Chemistry: an Introduction. Saunders College Publishing, 2000.
3. Ciola, R.; Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho. Editora Edgard Blücher, 1998.
4. Braithwaite, A.; Smith, F. J.; Chromatographic Methods. Kluwer Academic Publishers, 1999.
5. Poole, C. F.; The Essence of Chromatography. Elsevier Science, 2003.
6. Meyer, V. R.; Practical High-Performance Liquid Chromatography. John Wiley & Sons, 2010.
7. Sparkman, O. D.; Penton, Z. E.; Kitson, F. G.; Gas Chromatography and Mass Spectrometry: a practical guide. Elsevier, 2011.
8. Bouchonnet, S.; Introduction to GC-MS coupling. CRC Press, Taylor and Francis Group, 2013.
9. Neves, H. J. C.; Freitas, A. M. C.; Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução. Dias de Sousa.

